Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
Abteilung Onkologische Biochemie
Direktor: Prof. Dr. W. Staib

„Charakterisierung der Östrogenrezeptoren in intakten Zellen des Hühnereileiters und in Mammakarzinomzellen"

Dissertation

zur Erlangung eines Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Peter Subkowski

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
Abteilung Onkologische Biochemie

Direktor: Prof. Dr. W. Staib

„Charakterisierung der Östrogenrezeptoren in intakten Zellen des Hühnereileiters und in Mammakarzinomzellen"

Dissertation

zur Erlangung eines Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Peter Subkowski

1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent:
gez.: Prof. Dr. Bojar

Korreferent:
Prof. Dr. Krüskemper

INHALT SEITE

EINLEITUNG 1

MATERIAL UND METHODEN

A Material 9
I. Tiere 9
II. Mammakarzinome 9
III. Chemikalien 9
1. Zur Zellisolierung 9
2. Zu Hormonrezeptoranalysen 10

B Methoden 12
I. Isolierung der Hühnereileiterzellen 12
1. Operationstechnik 12
2. Gewinnung der Eileiterzellen 13
3. Modifizierte Gewinnung von Eileiterzellen 15
II. Kontrolle der morphologischen und funktionellen Intaktheit der Eileiterzellen 16
1. Morphologische Intaktheit 16
2. Funktionelle Intaktheit 17
III. Zellisolierung aus Mammakarzinomen 19
IV. Proteinbestimmung bei der Zellsuspension 24
V. Scatchardanalytik 25
1. Physiko-chemische Grundlagen 25
2. Durchführung der Scatchardanalysen an Hühnereileiterzellen 27
3. Durchführung der Scatchardanalysen nach Vorinkubation der Hühnereileiterzellen mit Diäthylstilböstrol 29
VI. Ganzzellbindungsstudien an Hühnereileiterzellen mit getrennter Auswertung der Hormonbindung in der Cytoplasma- und in der Kernfraktion 31
1. Theoretische Grundlagen des Kernseparators 31

2. Lichtmikroskopische Kontrolle der Zellaufschließung 33
3. Durchführung der Scatchardanalysen mit anschließender getrennter Auswertung der Bindung in Cytoplasma- und Kernfraktion 34
4. Parallelansätze mit Zellen ohne Steroidrezeptoren 36

VII. Translokationsstudien an Hühnereileiterzellen 38

VIII. Hemmversuche mit Puromycin und α-Amanitin 39
1. Theoretische Grundlagen 39
2. Translokationsstudien an Hühnereileiterzellen über eine Inkubationszeit von 220 Minuten 39

IX. Anwendung des entwickelten Ganzzellassays auf Mammakarzinome mit getrennter Auswertung der Bindung in Cytoplasma- und Kernfraktion 41

ERGEBNISSE

I. Ausbeute und Intaktheit der isolierten Zellen 42
1. Hühnereileiterzellen 42
2. Mammakarzinomzellen 47

II. Östrogenrezeptorbestimmung nach Scatchard an isolierten, intakten Hühnereileiterzellen 49
1. Ganzzellassay ohne Auftrennung in Kern- und Cytoplasmafraktion 49
2. Ganzzellassay mit Auftrennung in Kern- und Cytoplasmafraktion 51
3. Negativkontrolle mit Hühnererythrozyten 54

III. Ganzzellassay von Hühnereileiterzellen nach vorheriger einmaliger DES-Inkubation 56
1. Durchführung ohne Auftrennung der Zellen in eine Cytoplasma- und Kernfraktion 56

SEITE

2. Durchführung mit Auftrennung der Zellen in eine Cytoplasma- und Kernfraktion 59

IV. Translokationsstudien an isolierten Hühnereileiterzellen 60

V. Translokationsstudien an isolierten Hühnereileiterzellen mit Bestimmung des durch α-Amanitin und Puromycin hemmbaren Anteils der Rezeptorneusynthese 67

VI. Anwendung des Ganzzellassays auf Mammakarzinomzellen mit anschließender getrennter Auswertung der Bindung in der Cytoplasma- und der Kernfraktion 70

1. Lichtmikroskopische Kontrolle der Kernseparierung 70

2. Scatchardanalysen 71

DISKUSSION

I. Zellsuspensionen 75

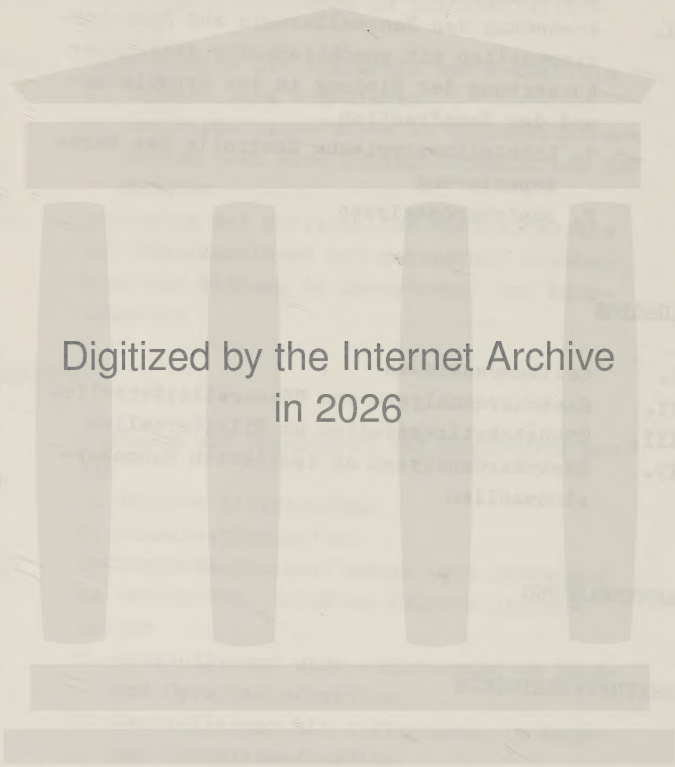
II. Scatchardanalysen von Hühnereileiterzellen 81

III. Translokationsstudien an Eileiterzellen 91

IV. Scatchardanalysen an isolierten Mammakarzinomzellen 101

ZUSAMMENFASSUNG 106

LITERATURVERZEICHNIS 110


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0030

EINLEITUNG

Schon früh wurde von Jensen und Jacobson (1962) mit tritiiertem 17ß-Östradiol eine spezifische Bindungskomponente für Steroidhormone in nicht-geschlechtsreifen Ratten festgestellt. Dieser Arbeitsgruppe war es als erster gelungen, tritiummarkierte Steroidhormone mit hoher spezifischer Aktivität zu synthetisieren. Die Anreicherung dieser Hormone fand in nennenswerter Konzentration nur in bestimmten Organen statt, von denen schon länger bekannt war, daß sie Zielorgane der entsprechenden Hormone im Tierkörper sind.

Aber erst Talwor et al. (1964) zeigten, daß 17ß-Östradiol nach dem Eindringen in die Zelle mit einem Makromolekül eine Bindung eingegangen war. Dieser Binder wurde von Jensen Östrogenrezeptor oder Östrophilin genannt.

Das grundsätzliche Verhalten des Gestagenrezeptors, das auch weitgehend für das Verhalten des Östrogenrezeptors repräsentativ ist, wurde vor allem von der Arbeitsgruppe um O'Malley (1969, 1974) am Eileitersystem des Huhns untersucht. Die daraus folgenden Vorstellungen lassen sich wie folgt darstellen:

Bei Abwesenheit der Steroidhormone sind die Rezeptoren im Cytoplasma der Zellen lokalisiert. Nach dem Eindringen der Hormone in die Zellen werden diese von den Rezeptoren gebunden und die Hormon-Rezeptorkomplexe in einem anschließenden temperaturabhängigen, bisher noch nicht restlos geklärten Prozeß aktiviert.

Dann erfolgt die Übertragung dieser aktivierten Hormon-Rezeptorkomplexe in den Kern (Translokation). Dort werden die Hormon-Rezeptorkomplexe an das Chromatin gebunden. Die Konsequenz dieser Bindung ist eine Änderung der Transkriptionsrate und des Spektrums der synthetisierten m-RNA. Auf der Translationsebene (Ribosomen) wird dann schließlich die umgeschriebene genetische Information zur Synthese spezifischer Eiweißmoleküle

verwendet. Über diese Regulation der Genaktivität steuern Steroidhormone Wachstum, Differenzierung und metabolische Aktivität ihrer Zielgewebe. So konnten z.B. Katzenellenbogen und Gorski (1972) zeigen, daß die uterine Aktivität in vivo direkt proportional zur Konzentration der Östradiol-Rezeptorkomplexe in der Zelle ist.

Das Vorhandensein eines Östrogenrezeptors stellte sich als ein unabdingbares Kriterium für die Definition eines Östrogenzielgewebes heraus. Auch bei einem Teil der Tumoren, die von einem Zielgewebe ausgehen, konnten Steroidrezeptoren nachgewiesen werden. Da dies jedoch nicht bei allen diesen Tumoren der Fall ist, kann man schließen, daß im Zuge des neoplastischen Entdifferenzierungsprozesses wohl einige Gewebe die Fähigkeit zur Rezeptorsynthese und damit ihre Hormonabhängigkeit verloren haben. Aber auch ein Nachweis der Rezeptorpositivität eines Tumors ist kein endgültiger Beweis für seine Hormonabhängigkeit, da es durch die Entdifferenzierung zu einer Störung der Signalübertragung,die hinter der Bindung der Hormone durch die Rezeptoren liegt,gekommen sein könnte (McGuire et al., 1977).

Eine hormonelle Abhängigkeit des Wachstums der Mammakarzinome wurde schon sehr früh von Schinzinger (1889) vermutet. Kurz danach entdeckte Beatson (1896), daß nach empirischer Ovarektomie, also nach der Entfernung des Hauptsyntheseorts der Östrogene, bei einem Teil der Mammakarzinome Remissionen zu beobachten waren.

Heute stehen zur hormonellen Therapie der Mammakarzinome hormonablative Verfahren (Ovarektomie, Adrenalektomie und Hypophysektomie) und hormonadditive Verfahren (bei Prämenopausepatientinnen vor allem die Applikation des Antiöstrogens Tamoxifen und alternativ eine Androgenapplikation; bei Postmenopausepatientinnen die Applikation pharmakologischer Östrogen- oder Gestagendosen) zur Verfügung (Schöll, 1975; Stoll, 1974; Castro, 1974; Kennedy, 1974; Legha et al., 1978).

Diese zum großen Teil empirisch entwickelten Therapieformen, die zudem oft eine große und unnötige Belastung für die schwerkranken Patientinnen darstellten, da eine objektive Remission, unabhängig von der verwendeten Methode, nur in 20 - 40 % auftrat (McGuire et al., 1977), machten es notwendig, nach geeigneten Auswahlkriterien für eine endokrine Therapie zu suchen. Dabei bot sich die oben schon skizzierte Korrelation zwischen dem Vorhandensein eines Steroidrezeptors und der hormonellen Abhängigkeit der Gewebe an.

Die Bestimmung der Östrogenrezeptorkonzentration im Cytosol einer großen Zahl von Mammakarzinomen (McGuire et al., 1977; Wittliff, 1976; Savlov et al., 1974; Jensen und DeSombre, 1977) zeigte, daß in einem hohen Prozentsatz diese von hormonabhängigem Milchgangsgewebe ausgehenden Tumoren Rezeptoren besaßen. Nach McGuire waren 75 % der Tumoren rezeptorpositiv; davon bei Primärtumoren 77 % und 66 % bei den Metastasen. Nach Savlov et al. sind bei 56 % der untersuchten Tumoren der 8 - 9 S Rezeptor nachzuweisen. Barnes et al. (1977) fanden bei 51 % der Patientinnen Rezeptoren im Tumorcytosol.

Der niedrigere Prozentsatz der Rezeptorpositivität der Tumormetastasen scheint Zeichen für die fortschreitende Entdifferenzierung des Tumorgewebes zu sein, das damit die Fähigkeit verliert, in seinem Wachstum auf Hormone zu reagieren.

Doch auch bei den rezeptorpositiven Tumoren ließen sich nur in einem Teil der Fälle objektiv nachweisbare Remissionen bei Einsatz der endokrinen Therapie erzielen. Bei Jensen und DeSombre (1977) war das bei 63 % der rezeptorpositiven Tumoren der Fall. McGuire et al. (1977) fanden bei 60 % der von ihnen untersuchten rezeptorpositiven Tumoren eine Remission nach Einsatz der endokrinen Therapie. Nach Rosen et al. (1977) war dies bei 65 % der Fall. Die Korrelation zwischen dem Rezeptornachweis und dem Erfolg der endokrinen Therapie ist also nicht absolut.

Es ließ sich aber zeigen, daß die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolges mit der Höhe der gemessenen Rezeptorkonzen-

tration steigt (Jensen und DeSombre, 1977; Savlov et al., 1974; Wittliff, 1977, 1978; McGuire, 1977). So konnten bei Patientinnen mit niedrigen Östrogenrezeptorkonzentrationen (< 10 fmol/mg Cytosolprotein, nach Liskowski et al., 1976a, 1976b) nur selten Remissionen nach irgeneiner der angewandten endokrinen Therapieformen beobachtet werden. Bei Konzentrationen über 100 fmol/mg Cytosolprotein war dies in 80 % der Fall.

Für das Verhalten der Mammakarzinome, die rezeptorpositiv waren und trotzdem keine Remissionen zeigten, gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten, von denen bisher keine endgültig bewiesen worden ist (erweitert nach Bruchovsky und Van Dorn, 1976):

1. Die objektiven Kriterien für eine Antwort auf die endokrine Therapie sind zu streng, d.h., daß eine leichte Remission, obwohl sie vorhanden ist, übersehen wird.

2. Es liegt eine Läsion im Wirkungsmechanismus der Hormone vor, die distal der Hormon-Rezeptorbindung lokalisiert ist. So ist es zum Beispiel denkbar, daß eine Störung der Translokation oder der Bindung der Steroid-Rezeptorkomplexe an das Chromatin zu einer Blockade in der Signalübertragung führt. Rochefort et al. (1980) haben z.B. in C3H-Mäusen und DMBA-Ratten eine Bindung der Östradiol-Rezeptorkomplexe an Akzeptorstellen im Kern festgestellt, ohne daß es zu einer Induktion des Östradiol-abhängigen Progesteronrezeptors gekommen war. Sie folgerten daraus, daß Akzeptor- und Effektorstellen des Chromatins nicht identisch seien und bei den von ihnen untersuchten Tumoren eine Störung in der Signalübertragung zwischen diesen beiden Stellen vorliege.

3. Der Tumor besteht aus einem Mosaik hormonsensibler und nicht-hormonsensibler Tumorzellen. Die sensiblen Zellen zeigen bei der endokrinen Therapie einen Wachstumstop. Der Tumor nimmt trotzdem insgesamt durch das Wachstum nicht-sensibler Zellen weiter an Größe zu. So zeigten Rosen et al. (1977), daß unterschiedliche Proben aus einem Mammakarzinom unterschied-

liche Rezeptorkonzentrationen besaßen. Emerson et al. (1960) wiesen mit Hilfe von Studien über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase nach, daß ein Mammakarzinom multizellulären Ursprungs sein kann. Dies könnte die unterschiedlich hohen Rezeptorkonzentrationen in verschiedenen Tumorregionen erklären.

Darüberhinaus bleibt die Frage zu klären, wodurch die von McGuire gefundenen 8 % falschnegativen Tumoren bedingt sind, die trotz fehlender Rezeptoren nach der empirischen Hormontherapie Remissionen aufwiesen, und wie diese Wirkung vermittelt wurde (McGuire et al., 1975a; Wittliff, 1974, fand bei 5 von 80 rezeptornegativen Tumoren Remissionen nach Einsatz der endokrinen Therapie).

Zur routinemäßigen Steroidrezeptorbestimmung werden heute im wesentlichen zwei verschiedene Methoden benutzt: die Dextrankohle-Methode und die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Beide Methoden sind nach dem Consensus Report der Konferenz "Steroid Receptors in Breast Cancer" (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, 27. - 29. Juni 1979) die z.Z. zuverlässigsten und reproduzierbarsten Methoden der Steroidrezeptoranalytik.

Zwei weitere weniger gebräuchliche Methoden sind die Protaminpräzipitation und die Agar-Gel-Elektrophorese (Einzelheiten über diese beiden Methoden sind bei McGuire et al., 1975a, 1975b, und bei Wagner, 1972, nachzulesen).

Die Dextrankohle-Methode ist nach McGuire die einfachste und sicherste Methode zur routinemäßigen Bestimmung der Östrogenrezeptoren (McGuire, 1975b). Bei dieser Methode wird das nach der Titration der Rezeptoren im Cytosol vorhandene freie Hormon an Dextran-beschichtete Kohle adsorbiert und anschließend durch Zentrifugation die Kohle entfernt. Die im Überstand verbliebenen Hormon-Rezeptorkomplexe werden dann in einem Szintillationszähler bestimmt.

Die Differenz zwischen der sogenannten totalen Bindung und der unspezifischen Bindung wird als spezifische Bindung (=Rezeptor-

bindung) bezeichnet. Die unspezifische Bindung, bestehend aus an Nicht-Rezeptorprotein gebundenem oder auch metabolisiertem Hormon, bleibt nach der Kompetition der spezifischen Bindung mit einem großen Überschuß an nicht-tritiiertem Hormon (z.B. Diäthylstilböstrol) erhalten (McGuire et al., 1975a, 1975b). Das freie, nicht-gebundene Hormon wird durch die Inkubation mit Dextrankohle abgetrennt.

Die andere allgemein anerkannte Methode ist die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, die von Toft und Gorski entwickelt wurde (1966).

Bei dieser Methode wird das Cytosol mit tritiiertem 17ß-Östradiol bzw. mit tritiiertem 17ß-Östradiol und Kompetitor inkubiert und anschließend auf einen 10 - 30 %igen Saccharosegradienten geschichtet, der dann über 16 Stunden bei bis zu 250 000 g zentrifugiert wird. Inzwischen ist mit dem Einsatz von Vertikalrotoren eine Methode entwickelt worden, bei der bei einer maximalen Beschleunigung von 400 000 g Trennzeiten von nur noch 2 Stunden benötigt werden (Bojar, 1980). Nach der Zentrifugation werden die einzelnen Fraktionen abgesammelt und gezählt.

Der Nachteil dieser Methode gegenüber der Dextrankohle-Methode ist der größere Aufwand, die fehlende Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d's), die ein Maß für die Stabilität der Hormon-Rezeptorkomplexe sind, und bei der älteren Durchführungsart die längere zeitliche Dauer.

Gegenüber der Dextrankohle-Methode lassen sich aber mit der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation leichter Artefakte von unspezifischer Bindung erkennen und zwischen den 4 S und 8 S-Formen des Rezeptors unterscheiden. Dies halten einige Autoren für wichtig, um die Funktionsform des Rezeptors beurteilen zu können (Wittliff, 1974, 1975, 1977, 1978; Savlov et al., 1974; McGuire et al., 1973, 1975a, 1975c, 1977).

Beide Methode bilden in der Rezeptorroutinebestimmung sinnvolle Ergänzungen zueinander. Wie oben aber schon erwähnt wurde, sind

beide Methoden in Hinblick auf falschpositive und falschnegative Ergebnisse noch zu verbessern.

Der Hauptnachteil der bisherigen Rezeptoruntersuchungen, die bei 4° C durchgeführt werden, ist, daß nicht alle sich in der Zelle befindenden Rezeptoren nachgewiesen werden können:

1. Im Kern befindliche Rezeptoren werden nicht miterfaßt.

2. Bei Prämenopausepatientinnen ist ein Teil der Rezeptoren mit endogenem Hormon besetzt. Diese Hormon-Rezeptorkomplexe können nicht bestimmt werden, da bei einer Temperatur von 4° C kein Austausch der gebundenen, endogenen Östrogene mit dem hinzugegebenen tritiiertem 17ß-Östradiol stattfindet (Anderson et al., 1972).

Beide Punkte können dazu führen, daß fälschlich zu niedrige Rezeptorkonzentrationen bestimmt werden.

Um diesen Fehlerquellen beim Rezeptorassay aus dem Wege zu gehen, bieten sich theoretisch Scatchardanalysen an isolierten, intakten Zellen an. Bei der Anwendung eines solchen Ganzzellassays sollten sowohl die im Kern befindlichen Rezeptoren erfaßt werden, als auch unter den bei 37° C gegebenen Exchange-Bedingungen die von endogenem Hormon besetzten Rezeptoren dem tritiierten Hormon zugänglich sein. Untersuchungen von McGuire und DeLaGarza (1973) zeigten, daß der Rezeptor nach der Cytosolpräparation bei einer Erhöhung der Temperatur von 4° C auf 30° C eine erhöhte Labilität aufwies und die MBC um die Hälfte sank. Um Exchange-Bedingungen realisieren zu können, muß der Rezeptor also in seinem physiologischen Zellmilieu verbleiben.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Isolierung von intakten Zellen aus Mammakarzinomen zu erarbeiten, um einen Ganzzellassay beim Mammakarzinom zu ermöglichen. Dabei zeigte es sich jedoch schnell, daß genügend vitales Mammakarzinomgewebe oft nicht zur Verfügung stand, um grundlegende Untersuchungen durchzuführen.

Nach fruchtlosen Vorversuchen an der Leber des Xenopus Levis erwies sich der Eileiter des Huhns als das am besten geeignetste Versuchsgewebe, da er auch in genügend großen Mengen jederzeit zur Verfügung stand und von ihm bekannt ist, daß eine hohe Östrogenrezeptorkonzentration im Cytosol vorhanden ist.

Nach der Entwicklung einer schonenden Zellisolierungsmethode mit genügend hoher Ausbeute und anschließenden Scatchardanalysen bot sich dieses Zellsystem dazu an, weitere grundlegende Versuche vorzunehmen, die dazu dienen sollten, die anschließend geplanten Ganzzellscatchardanalysen von Mammakarzinomen besser interpretieren zu können.

Es folgten daher zeitliche Bindungsstudien an den Hühnereileiterzellen und, nach Entwicklung einer Methode zur Auftrennung der intakten Zellen in ein Kern- und Cytoplasmakompartiment, zeitliche Translokationsstudien. Der danach erfolgende Einsatz von Hemmsubstanzen der Proteinsynthese sollte dazu dienen, Aufschlüsse über die Wiederauffüllung der cytoplasmatischen Rezeptorbestände nach der Translokation eines Teils dieser Rezeptoren in den Kern zu gewinnen. Dies geschah durch die kontinuierliche Inkubation der Zellen mit tritiiertem 17ß-Östradiol und die Bestimmung der Bindung in beiden Zellkompartimenten zu aufeinanderfolgenden Zeitpunkten.

Nach Abschluß dieser Versuche am Hühnereileiter, die den Schwerpunkt meiner Arbeit bilden, konnte ich dazu übergehen, die beim Hühnereileiter erarbeitete Zellisolierungsmethode auf das Mammakarzinomgewebe zu übertragen. Aufgrund der ausgeprägten Verschiedenheit dieser beiden Gewebe waren dazu jedoch mehrere Modifikationen notwendig.

Einige exemplarische Ganzzellscatchardanalysen an aus Mammakarzinomen mit dieser Methode gewonnenen Zellen bilden dann den Abschluß dieser Arbeit.

MATERIAL UND METHODEN

A Material

I. Tiere

Ausgewachsene Legehühner, 1,0 - 1,5 kg Körpergewicht, aus der Geflügelzucht Garath in Düsseldorf.

II. Mammakarzinome

Es wurden Mammakarzinome verschiedenen histologischen Typs und verschiedener Größe für die Untersuchungen verwendet. Das Gewebe wurde mit freundlicher Unterstützung der jeweiligen gynäkologischen und chirurgischen Abteilungen des Bethesdakrankenhauses Duisburg, der gynäkologischen Abteilung des St. Lukaskrankenhauses Neuß, des St. Lukaskrankenhauses Solingen und der gynäkologischen Abteilung der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

III. Chemikalien

1. Zur Zellisolierung

Kollagenase, Typ II
Hersteller: Boehringer, Mannheim

Hyaluronidase, Typ II
Hersteller: Boehringer, Mannheim

Trypsin
Hersteller: Boehringer, Mannheim

DNAase, Typ II
Hersteller: Boehringer, Mannheim

Elastase
Hersteller: Boehringer, Mannheim

Pronase
Hersteller: Boehringer, Mannheim

Minimal Essential Medium (MEM), Typ Eagle
Hersteller: Flow Laboratories, Bonn

Evipan - Natrium, 0,5 g Natriumsalz der Methyl-cyclohexenyl-methyl-barbitursäure (Hexobarbital - Natrium)/ 5 ml
Hersteller: Bayer, Leverkusen

Hepes (N-2-hydroxyäthyl-piperazine-N'-2-äthanolsulfonsäure)
Hersteller: Flow Laboratories, Bonn

Liquemin, 25 000 USP - E. Natriumheparinat
Hersteller: Hoffman - LaRoche

Trypanblau (1 %ige Lösung in 0,9 %iger NaCl)
Hersteller: Gibco, Glasgow, England

Rinderserumalbumin (Fraktion V)
Hersteller: Miles - Seravac, Maidenhead, England

2. Zu Hormonrezeptoranalysen

(6,7 - ^{3}H) - Östradiol - 17ß
(spezifische Aktivität 41 - 49 Ci/mmol)
Hersteller: New England Nuclear (NEN), bzw. Amersham Buchler

Diäthylstilböstrol (DES)
Hersteller: Merck, Darmstadt

(U-^{14}C) L-Leucin
(spezifische Aktivität 10 Ci/mmol)
Hersteller: Amersham Buchler

α-Amanitin
Hersteller: Boehringer, Mannheim

Puromycin
Hersteller: Sigma, St. Louis, USA

Norit A
Hersteller: Serva, Heidelberg

Dextran T 500
Hersteller: Pharmacia, Uppsala, Schweden

Tris - HCl (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid)
Hersteller: Serva, Heidelberg

Lymphocyte Separation Medium
Hersteller: Flow Laboratories, Bonn

Biofluor
Hersteller: New England Nuclear (NEN)

Soluene - 350
Hersteller: Packard, Warrensville, USA

Dimilume - 30
Hersteller: Packard, Warrensville, USA

Alle übrigen verwendeteten Chemikalien und Reagenzien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, geliefert. Sie hatten den Reinheitsgrad p.A.

Die Reinheit der tritiierten Hormone wurde monatlich durch dünnschichtchromatographische Auftrennung auf Fertigplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F-254) in Chloroform und Äthanol (v/v; 8/2) überprüft. Die Auswertung erfolgte mit einem BF-Scanner, Typ LB 2721.

Für die hilfreiche Unterstützung bei der Planung und Konstruktion des Kernseparators danke ich Hr. Kump und Hr. Müller von der Werkstatt des Institutes für physiologische Chemie II der Universität Düsseldorf.

B Methoden

I. Isolierung der Hühnereileiterzellen

Vorversuche, die an der Leber des Xenopus Levis unternommen wurden, um einen Ganzzellassay für die Steroidrezeptoranalyse in Mammakarzinomen zu entwickeln, zeigten, daß eines der Hauptprobleme die genügend hohe Ausbeute an intakten, isolierten Zellen darstellte. Als Modellgewebe wählte ich daher den Hühnereileiter, der in dieser Hinsicht ein ideales Versuchsobjekt darstellte. So erreichte der Hühnereileiter beim ausgewachsenen Legehuhn ein Gewicht von 25 - 30 g Feuchtgewicht (im Gegensatz zu einem maximalen Lebergewicht von 1,5 g bei dem Xenopus Levis).

1. Operationstechnik

Die Narkose des Huhns erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 0,7 ml Evipan/kg Körpergewicht, entsprechend einer Konzentration von 0,07 g Hexobarbital - Natrium/kg Körpergewicht. Zur Gerinnungshemmung wurden 1,2 ml Liquemin/kg Körpergewicht, entsprechend 6000 USP - Einheiten Natriumheparinat/kg Körpergewicht gegeben.

Nach dem Entfernen der Federn wurde die Bauchmuskulatur dicht unterhalb des Rippenbogens durchtrennt und der Schnitt, ohne dabei den Darm zu perforieren, nach unten Y-förmig verlängert.

Das Darmpaket wurde dann herausgeklappt und zur Seite geschlagen, um Zugang zu dem Eileiter im hinteren Bauchraum zu erlangen. Dieser wurde dicht unterhalb des Ovars und oberhalb der Schalendrüse, die dem Uterus der Säugetiere entspricht, durchtrennt und herausgenommen.

Nach der Exstirpation wurde der Eileiter sofort in calciumfreiem Krebs-Ringer Hydrogenkarbonatpuffer (Krebs und Henseleit, 1932) mit einem pH von 7,4 bei 0° C heruntergekühlt, um den Zellmetabolismus zu verlangsamen.

Daran anschließend erfolgte das Abpräparieren des Eileiterperitoneums und das Spülen des Eileiters im oben genannten Puffer.

2. Gewinnung der Eileiterzellen

Der Eileiter wurde dann mit einer scharfen Schere bei 0° C zu Gewebsfragmenten von circa 1 mm Kantenlänge zerkleinert, gewogen und anschließend mit dem fünffachen Volumen Krebs-Ringer Phosphatpuffer (pH 7,4) in einer Carbogenatmosphäre (95 % Sauerstoff und 5 % CO_2) über insgesamt 40 Minuten inkubiert (s. Abb. 1). Die enzymatische Inkubation wurde mit der Zugabe von 20 mg Kollagenase/g Gewebefeuchtgewicht begonnen. Die Inkubationstemperatur des Schüttelbads (Braun, Melsungen) betrug 37° C. Die Inkubationsansätze wurden mit einer Frequenz von 120/min und einer Amplitude von 2,5 cm bewegt.

Zusätzlich erfolgte nach 20 und nach 40 Minuten der Inkubationszeit ein mechanischer Aufschließungsschritt durch wiederholtes Pipettieren der Eileiterzellsuspension mit einer umgekehrt gehaltenen 25 ml-Pipette. Die Carbogenatmosphäre wurde anschließend jeweils wieder erneuert.

Nach der darauffolgenden Filtration der Suspension durch ein Maschengewebe mit 150 µm Maschenweite wurde die Zellsuspension in Minimal Essential Medium (MEM) resuspendiert und durch eine sich anschließende 30-sekündige Zentrifugation bei 1000 Upm (Heraeus Christ, Typ Labofuge I) von Verunreinigungen und Zelltrümmern weitgehend befreit. Dieser Vorgang wiederholte sich danach noch zweimal.

Das endgültige Sediment wurde gewogen und zur Herstellung einer 5 oder 10 %igen Zellsuspension je nach Fragestellung nur in einem MEM- oder MEM-fötalen Rinderserum-Medium (v/v; 1/1; pH 7,4) aufgenommen.

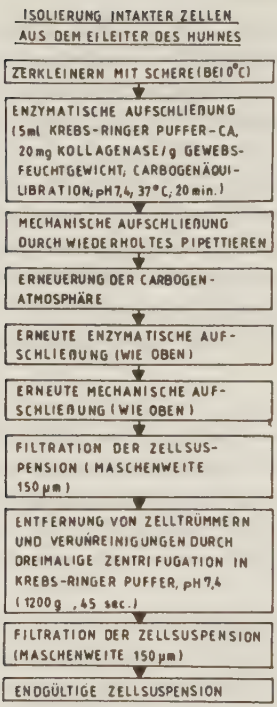


Abb. 1: Zellisolierung aus dem Hühnereileitergewebe

3. Modifizierte Gewinnung von Eileiterzellen

Bei einigen Fragestellungen war es notwendig, die Zellsuspension unter absolut sterilen Bedingungen herzustellen, um eine zu starke Keimvermehrung in der Zellsuspension zu vermeiden, wie sie bei einer Inkubationszeit von 6 Stunden und bei einer Temperatur von 37° C in einem Kulturmedium zu erwarten ist.

Zu diesem Zweck wurde die Exstirpation des Eileiters und seine weitere Aufarbeitung mit sterilen Instrumenten und in sterilen Einmalbehältern vorgenommen. Die Arbeitsschritte nach der Entnahme fanden zum größten Teil in einem Laminar Airflow-Gerät (Flow Laboratories) statt, das durch vertikal gerichtete Luftströmungen eine Kontamination mit Keimen zu vermeiden half. Die Inkubation der Zellen erfolgte in sterilen 250 ml-Einmalkulturflaschen. Die im Kapitel Methoden I. 2. beschriebenen Puffer und die zur Titration verwendeten Hormone wurden vorher steril filtriert. Die Kontamination der Zellsuspension nach der 6-stündigen Inkubationszeit wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

Diese modifizierte Zellgewinnung war nur bei den Leucineinbaustudien notwendig, da bei den Translokationsstudien mit der maximal 4-stündigen Inkubationszeit sich die Keimzahl lichtmikroskopisch kaum bemerkbar machte.

II. Kontrolle der morphologischen und funktionellen Intaktheit der Eileiterzellen

1. Morphologische Intaktheit

Die morphologische Intaktheit der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe der Trypanblau-Färbung (Paul, 1975) untersucht. Dabei wurde die Zellsuspension unter dem Lichtmikroskop in einer Neugebauer-Zählkammer nach Zugabe des gleichen Volumens Trypanblau und 5-minütiger Inkubation in Hinblick auf die Gesamtzellzahl und die Zahl der geschädigten Zellen ausgezählt.

Bei der Trypanblau-Methode geht man von der Voraussetzung aus, daß intakte Zellen eine funktionsfähige semipermeable Zellmembran besitzen und deshalb den großmolekularen, hydrophilen Farbstoff nicht in das Zellinnere aufnehmen. Bei Zellen mit geschädigter Zellmembran färbt sich dagegen die Zelle und insbesonders der Zellkern an.

Die Viabilität der Zellen errechnet sich nach der Auszählung der geschädigten Zellen wie folgt:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl} - \text{Zahl der geschädigten Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100 = \% \text{ Viabilität}$$

Darüberhinaus wurde mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen die morphologische Intaktheit der Zellmembran und der Zellorganellen untersucht. Mit Hilfe dieser Aufnahmen konnte weiterhin eine Unterteilung der lichtmikroskopisch nahezu homogenen Zellpopulation (mit Ausnahme der auch lichtmikrokopisch gut unterscheidbaren Flimmerepithelzellen) in mehrere Subtypen vorgenommen werden.

2. Funktionelle Intaktheit

Die funktionelle Intaktheit der isolierten Zellen läßt sich mit Hilfe des Einbaus von (U-^{14}C) L-Leucin in neusynthetisierte Zellproteine abschätzen. Dabei geht man von der Vorstellung aus, daß Suspensionen intakter Zellen unter optimalen Bedingungen in dem Inkubationsmedium angebotene Aminosäuren zur Synthese zelleigener Proteine verwenden.

Dieser Nachweis der Zellfunktionstüchtigkeit wurde durchgeführt, nachdem die Zellen bei 37° C über 6 Stunden inkubiert worden waren. Die Einbauraten dieser Zellen wurden verglichen mit den Einbauraten in Zellen derselben Suspension vor Beginn der Inkubation.

In Parallelansätzen wurde zusätzlich α-Amanitin bzw. Puromycin hinzugegeben, um zu sehen, inwieweit die Zellen nach 6 Stunden Inkubationszeit noch auf diese Hemmsubstanzen reagierten, und um die maximale Hemmbarkeit der Proteinsynthese beurteilen zu können.

Nach Ablauf der 6-stündigen Inkubationszeit bzw. direkt nach Herstellung der Zellsuspension wurde das Medium durch 30-sekündige Zentrifugation bei 1000 Upm (Heraeus Christ, Typ Labofuge I) von den Zellen getrennt und ersetzt durch 1 ml calciumhaltigen Krebs-Ringer Hydrogenkarbonatpuffer (pH 7,4), der 11 mmol Glucose/l und 0,606 g/l eines Aminosäuregemisches nach Eagle (1959) enthielt, und dem nur die Aminosäure L-Leucin fehlte.

An ihrer Stelle wurden zu jedem Ansatz 100 µl ^{14}C markiertes L-Leucin gegeben, die jeweils 2,5 µCi (U-^{14}C) L-Leucin enthielten und anschließend diese Ansätze im Schüttelbad bei 37° C (120/min Schüttelfrequenz, 2,5 cm Amplitude) eine halbe Stunde inkubiert.

Der Inkorporationsvorgang wurde durch Zugabe von 100 µl einer gesättigten L-Leucinlösung (L-Leucin in H_2O) und 100 µl 30 %iger

Perchlorsäure gestoppt (Slein, 1961). Der Überstand wurde 10 Minuten bei 3000 Upm (Labofuge I) abzentrifugiert und das Präzipitat aus Perchlorsäure-fällbarem Material dreimal mit je 3 ml 0,6 normaler Perchlorsäure, die jeweils 100 µl der gesättigten L-Leucinlösung enthielten, gewaschen, um nicht inkorporiertes (U-^{14}C) L-Leucin zu entfernen.

Anschließend wurde das nun von freiem (U-^{14}C) L-Leucin gereinigte Präzipitat in 250 µl Wasser und 1 ml Soluene 350 (Packard) gelöst und 10 Stunden bei 25^{o} C hydrolysiert.

Nach erneuter, gründlicher Durchmischung des Hydrolysats wurden jeweils 500 µl mit 10 ml Dimilume 30 (Packard) versetzt und in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard Tricarb 2560) ausgewertet.

Ein weiterer Hinweis auf die funktionelle Intaktheit der isolierten Hühnereileiterzellen ist die im Lichtmikroskop zu beobachtende Bewegung der Zilien der Flimmerepithelzellen.

III. Zellisolierung aus Mammakarzinomen

Die Übertragung der beim Hühnereileiter entwickelten Zellisolierungsmethode führte beim Mammakarzinom zu Problemen, da die Isolierung von Zellen aus den oft sehr grundsubstanzreichen, faserhaltigen Tumoren ungenügend war. Es mußten mehrere Modifikationen vorgenommen werden, die schließlich zu folgenden praktikablen Methoden führten:

Methode A (s. Abb. 2)

Der Tumor wurde sofort nach seiner Entnahme, d.h. im Operationssaal, in Krebs-Ringer Hydrogenkarbonatpuffer (ohne Calcium, pH 7,4) heruntergekühlt und dann zu etwa erbsgroßen Fragmenten mit einer scharfen Schere zerkleinert.

Nach dem Transport in einem mit Eis gefüllten Dewar-Isolierbehälter wurde der Tumor bei 0° C im Kühlraum mit Schere und Skalpell rund 30 Minuten bis auf Gewebsfragmente von circa 1 mm Kantenlänge zerkleinert.

Die enzymatische Aufschließung des Tumors erfolgte in 5 ml/g Feuchtgewicht Krebs-Ringer Hydrogenkarbonatpuffer (ohne Calcium, pH 7,4) über 15 Minuten bei 37° C im Schüttelbad (120/min Schüttelfrequenz, 2,5 cm Amplitude) mit 5 mg/g Feuchtgewicht Hyaluronidase und 10 mg/g Feuchtgewicht Kollagenase. Versuche mit anderen Enzymen (z.B. mit 5 mg DNAase und 5 mg Elastase/g Feuchtgewicht), um die Bildung von schleimigen Aggregaten aus dem Chromatin aufgebrochener Zellen zu verringern, führten zu keiner Verbesserung der Ausbeute.

Der nächste Schritt umfaßte die mechanische Aufschließung des Tumorgewebes durch wiederholtes Pipettieren der Suspension aus Tumorfragmenten mit einer umgekehrt gehaltenen 25 ml-Pipette.

Nach 30-sekündiger Sedimentation der noch nicht aufgeschlossenen Tumorfragmente wurde der gewonnene Zellüberstand dekantiert.

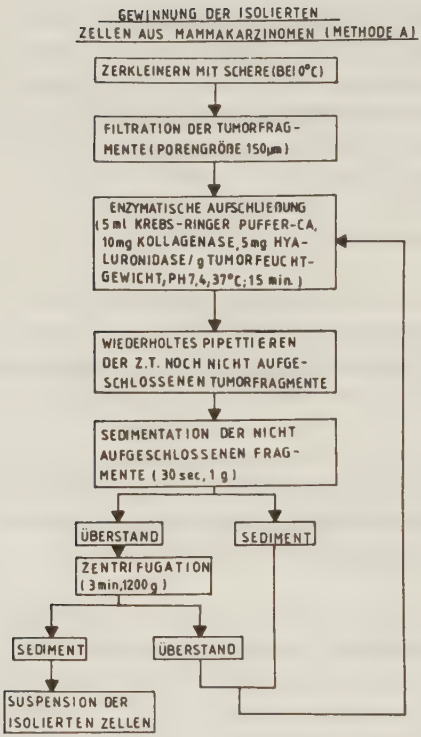


Abb. 2: Methode A zur Isolierung von intakten Zellen aus Mammakarzinomen

Nach 3-minütiger Zentrifugation des gewonnenen Zellüberstandes (1200 g, Heraeus Christ, Typ Labofuge I) ging der aus dieser Zentrifugation stammende Überstand, der noch alle oben genannten Enzyme enthielt, mit dem Sediment aus den noch nicht aufgeschlossenen Gewebsfragmenten wieder für weitere 15 Minuten in den enzymatischen Aufschließungsprozess ein. Dieser Vorgang wiederholte sich solange, bis der Tumor vollständig aufgeschlossen war (s. Abb. 2)

Methode B (s. Abb. 3)

Da bei Methode A die Ausbeute an Zellen bei den meist unter 10 g wiegenden Tumoren nicht zufriedenstellend war (<5 % des Tumorfeuchtgewichts), inkubierte ich den Tumor nach dem Transport und dem Zerkleinern (wie bei Methode A) in dem nur dreifachen Volumen Krebs-Ringer Phosphatpuffer (ohne Calcium, pH 7,4). Außerdem wurde die Kollagenasekonzentration auf 15 mg/g Feuchtgewicht erhöht.

Diese Inkubation erfolgte bei 4° C in der Kühlkammer über 10 Stunden. Dies geschah mit der Überlegung, daß bei der Inkubation der Tumorfragmente bei 37° C mit Sauerstoff- und Substratdiffusionsstörungen in den zentralen Partien der Gewebspartikel zu rechnen ist, die zu Zellschädigungen und zu einer verminderten Ausbeute an vitalen Zellen führen könnten. Diese kalte Inkubationsphase sollte den Enzymen die Möglichkeit geben, in das Innere der Fragmente zu diffundieren, während der Zellmetabolismus und damit der Sauerstoffbedarf reduziert war. Der Behälter mit den Gewebsfragmenten war dabei auf eine Trommel montiert, die sich, durch einen Motor angetrieben, in 5 Minuten einmal um ihre eigene Achse drehte, so daß eine gleichmäßige Durchmischung gewährleistet war.

Anschließend fand wie bei Methode A eine mechanische Aufschließung mit einer umgekehrt gehaltenen 25 ml-Pipette statt, der eine 20-minütige Inkubation im Schüttelbad bei 37° C nachge-

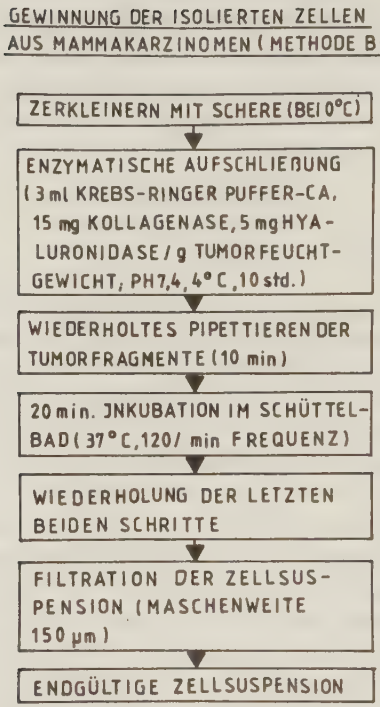


Abb. 3: Methode B und C zur Isolierung von intakten Zellen aus Mammakarzinomen. Bei Methode B erfolgte die Aufarbeitung des Tumors unmittelbar im Operationssaal. Methode C erlaubte einen Transport der Tumors in gekühlter physiologischer Kochsalzlösung nach der Entnahme.

schaltet wurde (Braun, Melsungen, 120/min, 2,5 cm Amplitude).

Es erfolgte dann eine Wiederholung der mechanischen Aufschließung und der 20-minütigen Inkubation.

Die so hergestellte Zellsuspension wurde dann durch Gaze mit 150 µm Maschenweite filtriert, um nicht-aufgeschlossene Gewebsfragmente zu entfernen.

Methode C (s. Abb. 3)

Bei Anwendung dieser Methode wurde gegenüber Methode B auf ein sofortiges Weiterverarbeiten des Tumors im Operationssaal verzichtet und der Tumor nur in gekühlter, steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung zum Labor transportiert. Die darauf folgende Weiterverarbeitung erfolgte analog zu Methode B.

Die mit Hilfe der drei oben beschriebenen Methoden (Methode A, B, C) gewonnenen Zellsuspensionen wurden nach der Filtration durch Gewebe mit 150 µm Maschenweite dreimal bei 1000 Upm für 35 Sekunden zentrifugiert (Labofuge I) und jeweils wieder in MEM resuspendiert. Das endgültige Zellsediment wurde in Gramm Feuchtgewicht bestimmt und eine der jeweiligen Fragestellung entsprechende Suspension mit MEM oder einem MEM-foetalen Rinderserum-Medium (v/v; 1/1) hergestellt.

IV. Proteinbestimmung bei der Zellsuspension

Der Proteingehalt der Zellsuspensionen wurde mit Hilfe der Biuretmethode bestimmt (Weichselbaum, 1946; Richterich, 1971; Rick, 1972).

Eine Eichkurve wurde mit steigenden Volumina einer 1 %igen Rinderserumalbuminlösung erstellt (0,1 - 2,0 ml), die mit physiologischer Kochsalzlösung jeweils auf 2,5 ml aufgefüllt wurden.

Es erfolgte dann eine 30-minütige Inkubation der angesetzten Konzentrationen mit je 5 ml Biuretlösung in einem 60° C warmen Wasserbad. Danach wurde die Extinktion der Werte gegen einen Leerwert, bestehend aus 2,5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung und 5 ml des Biuretreagenzes, bei 546 nm in einem Eppendorf-Fotometer abgelesen.

Von der verwendeten Zellsuspension wurden 0,2 ml mit 0,5 ml 1 normaler NaOH bei 60° C im Wasserbad über 3 Stunden hydrolysiert, mit 1,8 ml physiologischer Kochsalzlösung und 5 ml Biuretreagenz versetzt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß inkubiert.

Dieses Hydrolysat wurde dann gegen den oben beschriebenen Leerwert bei 546 nm im Eppendorf-Fotometer abgelesen und mit Hilfe der Eichkurve der Proteingehalt in Milligramm errechnet.

V. Scatchardanalytik

1. Physiko-chemische Grundlagen

Bei der Titration der Bindungsstellen wird zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung des Hormons unterschieden, wobei die spezifische Bindung die Kriterien eines Rezeptors erfüllt, d.h. hohe Spezifität, hohe Affinität und eine begrenzte Kapazität besitzt. Die spezifische Bindung wird als Differenz zwischen der totalen Bindung des tritiierten 17ß-Östradiols und seiner Restbindung nach Kompetition mit 1 µmol/l Diäthylstilböstrol (DES) bestimmt (Träger, 1977).

Ausgehend von der Voraussetzung, daß immer nur ein Steroidmolekül pro Rezeptor gebunden wird, verhält sich diese Bindung nach dem Massenwirkungsgesetz wie folgt:

$$[\text{Hormon}] + [\text{Rezeptor}] \rightleftharpoons [\text{Hormon-Rezeptorkomplex}]$$

$$[H] + [R] \rightleftharpoons [HR]$$

Daraus ergibt sich die scheinbare Assoziationskonstante K_a bzw. die scheinbare Dissoziationskonstante K_d als:

$$K_a = \frac{1}{K_d} = \frac{[HR]}{[H] \times [R]}$$

Diese Konstanten können mit der Gleichung, die Scatchard aus dem Massenwirkungsgesetz wie unten folgt ableitete, bei bekannten Konzentrationen des hinzugegebenen tritiierten 17ß-Östradiols und der gemessenen Konzentration der Hormon-Rezeptorkomplexe bestimmt werden. Dabei entspricht:

$[B]$ = Konzentration des gebundenen Hormons
$[F]$ = Konzentration des freien Hormons
$[R_o]$ = Gesamtkonzentration der Rezeptoren

Durch Einsetzen dieser Begriffe in das Massenwirkungsgesetz ergibt sich:

$$\frac{[B]}{[F] \times [R_o - B]} = \frac{1}{K_d} =$$

$$\frac{[B]}{[F]} = \frac{1}{K_d} \times [R_o - B] =$$

$$\frac{[B]}{[F]} = -\frac{1}{K_d}[B] + \frac{[R_o]}{K_d}$$

Diese Gleichung, die von Scatchard abgeleitet wurde, entspricht einer Geradengleichung vom Typ $y = ax + b$.

Nach dem Auftragen des gebundenen zum freien Hormon $[B/F]$ auf der Ordinate gegen die molare Konzentration des gebundenen Hormons $[B]$ auf der Abzisse ergibt sich dann eine Gerade, deren Steigung ein Maß für die scheinbare Dissoziationskonstante K_d ist.

Diese Gerade schneidet die Ordinate, wenn $[B]$ gleich Null ist, d.h. wenn die Rezeptoren kein Hormon gebunden haben. Der Wert auf der Ordinate beträgt für diesen Schnittpunkt $\frac{[R_o]}{K_d}$.

Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergibt sich, wenn $[B] = [R_o]$ ist, d.h. wenn alle Rezeptoren mit Hormon abgesättigt sind. Die Konzentration des gebundenen Hormons in mol/l an diesem Punkt entspricht dann der maximalen Bindungskapazität der Rezeptoren (= MBC).

Aus der Darstellung der Bindung nach der Gleichung von Scatchard lassen sich also die scheinbare Assoziationskonstante K_a bzw. die scheinbare Dissoziationskonstante K_d und die maximale Bindungskapazität der Rezeptoren ablesen.

Entscheidend dabei ist, daß die Entfernung des freien, nichtgebundenen Hormons schnell genug abläuft, um die nach dem Massenwirkungsgesetz ablaufende Dissoziation der Hormon-Rezeptorkomplexe möglichst gering zu halten. Bei der Dextrankohle-Methode wird eine schnelle Trennung des freien vom gebundenen Hormon durch Adsorption an die Dextran-beschichtete Kohle erreicht, ohne daß es zu einer nennenswerten Dissoziation bereits gebundener Hormone kommt. Die Dextranbeschichtung der Kohlepartikel hat dabei das Ziel, das Adsorptionsvermögen der Kohle für Proteine und damit auch für Rezeptoren zu vermindern.

2. Durchführung der Scatchardanalysen an Hühnereileiterzellen

Nach der Gewinnung von isolierten, intakten Zellen aus dem Hühnereileiter ergab sich das Problem, bei den Ganzzellassays das freie, nicht-gebundene Hormon möglichst quantitativ zu entfernen und den unspezifisch gebundenen Anteil so klein wie möglich zu halten, da sonst durch die Streubreite der dann gegebenen Radioaktivität der spezifische Anteil der Bindung verdeckt und eine Auswertung unmöglich gemacht worden wäre.

Die Übertragung der beim Cytosol angewandten Dextrankohle-Methode auf die isolierten Einzelzellen bewährte sich nicht, da die Kohlegranula mit den Zellen zusammen sedimentierten und auch bei verschiedenen Änderungen der Zentrifugationsbedingungen aufgrund der starken Adsorption der Zellen an die Kohlegranula eine saubere Trennung dieser beiden Komponenten nicht möglich war.

Nach weiteren nicht zufriedenstellenden Versuchen mit verschiedenen Ölen und Dextran-beschichteten Kohlegranula einer defi-

nierten Größe stellte sich als für diesen Zweck am geeignetsten 2,5 %iges Rinderserumalbumin in MEM (pH 7,4) heraus.

Die 10 %ige Zellsuspension, deren Herstellung oben beschrieben worden ist, wurde in zwei gleich große Ansätze aufgeteilt. Zu einem der beiden Volumina wurde Diäthylstilböstrol (DES), das vorher unter Vakuum eingedampft und dann in 50 µl Äthanol abs. aufgenommen worden war, hinzugegeben, bis eine Endkonzentration von 10^{-6} mol/l erreicht wurde.

Beide Volumina wurden dann in Einzelansätze zu je 500 µl Zellsuspension aufgeteilt, die nun zur einen Hälfte den Kompetitor DES und zur anderen Hälfte keinen Kompetitor besaßen.

Im Vakuum eingedampft wurde auch die Menge an tritiiertem 17ß-Östradiol, die nötig war, um die Zellansätze mit steigenden Konzentrationen dieses Hormons (von 1 - 10 nmol/l) zu inkubieren. Nach dem Wiederaufnehmen des Hormons in 50 µl Äthanol abs. erfolgte die Verdünnung in einem entsprechenden Volumen MEM und die Verteilung (in je 500 µl MEM) auf die Einzelansätze der Zellsuspensionen, so daß schließlich Einzelansätze resultierten, die 1 ml einer 5 %igen Zellsuspension mit der jeweiligen tritiierten 17ß-Östradiolkonzentration und (oder ohne) Kompetitorkonzentration enthielten.

Es wurden von jeder Konzentration des tritiierten 17ß-Östradiols drei Werte mit und drei Werte ohne Kompetitor angesetzt. Diese Ansätze wurden in 25 ml-Polyäthylenszintillationsröhrchen (Packard), die gasdicht eine Carbogenatmosphäre enthielten, bei 37° C über 30 Minuten in einem Schüttelbad inkubiert (Braun, Melsungen, 120/min Frequenz, 2,5 cm Amplitude).

Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension der Einzelansätze in 3 ml-Polyäthylenröhrchen überführt, die dann bei 2400 Upm 3 Minuten zentrifugiert wurden (Beckman, Typ J-6).

Nach dem Dekantieren des Überstandes und dem Resuspendieren des Zellpellets in 2,5 ml 2,5 %iger Rinderserumalbuminlösung

in MEM (pH 7,4) wurden die Ansätze bei 2400 Upm über drei Minuten zentrifugiert (Beckman, Typ J-6). Dieser Waschvorgang wiederholte sich insgesamt dreimal, bevor das Zellsediment in 100 µl Aqua bidest. resuspendiert und mit 500 µl Äthanol abs. über 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Versuche mit Parallelansätzen, die zellsubstanzlösende Mittel wie z.B. Hydroxide of Hiamine oder Soluene 350 (Packard) anstelle von Äthanol abs. enthielten, zeigten, daß diese innerhalb der methodenbedingten Schwankungsbreite nur unwesentlich mehr Radioaktivität aus den Zellen herauslösen konnten, als dies mit Äthanol abs. möglich war.

3. Durchführung der Scatchardanalysen nach Vorinkubation der Eileiterzellen mit Diäthylstilböstrol

Die Hauptinkubation und das Entfernen des freien Hormons liefen wie unter Methoden V. 2. beschrieben ab. Vor der eigentlichen Inkubation mit tritiiertem 17ß-Östradiol wurden jedoch aus der Zellsuspension drei Ansätze mit gleich großen Volumina gebildet, von denen der erste mit 1 x 10^{-9} mol/l DES, der zweite mit 1 x 10^{-8} mol/l DES und der dritte ohne Hormonzugabe über 10 Minuten bei 37° C im Schüttelbad in 25 ml-Polyäthylenszintillationsröhrchen mit einer Carbogenatmosphäre inkubiert wurden (120/min Frequenz, 2,5 cm Amplitude).

Anschließend wurden die Inkubationsansätze über 3 Minuten bei 2400 Upm zentrifugiert und der Überstand dekantiert (Beckman, Typ J-6).

Das Sediment wurde dann jeweils zweimal in 10 ml MEM (pH 7,4) resuspendiert und bei 2400 Upm abzentrifugiert, um eventuell im Zellsediment verbliebenes freies Hormon vollständig zu entfernen.

Danach wurden die Zellsedimente wieder in einem entsprechenden Volumen MEM resuspendiert und nach den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen getrennte 500 µl Ansätze in 25 ml-

Polyäthylenröhrchen angesetzt. Die Inkubation dieser Einzelansätze mit tritiiertem Hormon und Kompetitor erfolgte dann, wie unter Methoden V. 2. beschrieben wurde.

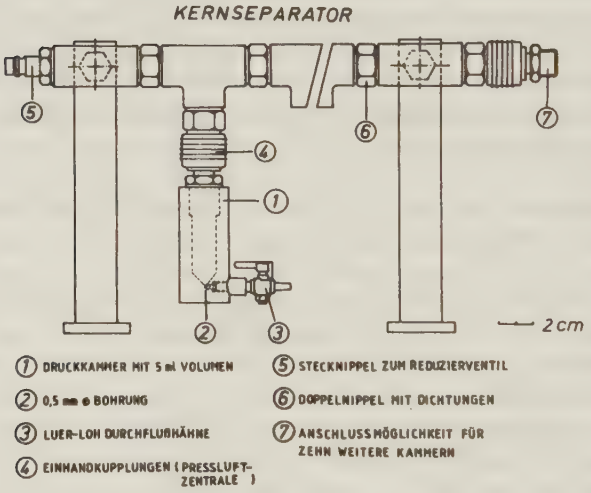


Abb. 4: Kernseparator nach dem Prinzip der Yeda-Press. Von den insgesamt 10 zur Verfügung stehenden Kammern des Geräts ist nur eine schematisch wiedergegeben.

VI. Ganzzellbindungsstudien an Hühnereileiterzellen mit getrennter Auswertung der Hormonbindung in der Cytoplasma- und in der Kernfraktion

1. Theoretische Grundlagen des Kernseparators

Um das zeitliche und quantitative Verhalten der Translokation beurteilen zu können, schien es wünschenswert, nicht von Anfang an mit isolierten Kernen und davon unabhängig hergestelltem Cytosol zu arbeiten, sondern zuerst die intakten Zellen mit nicht, oder zumindest nur wenig, beeinflußtem intrazellulären Milieu mit dem radioaktiv markierten Hormon in Kontakt zu bringen und erst nach der Inkubation zwischen Kern und Cytoplasma zu trennen.

Da man es bei den geplanten Versuchen mit einer Vielzahl von Einzelansätzen zu tun hatte und es besonders bei den kinetischen Studien auf eine schnelle und zeitlich parallele Trennung der Einzelansätze ankam, eigneten sich Handhomogenisatoren aus Glas, wie sie für die Herstellung von Kernen aus großen Volumina von Zellsuspensionen verwendet werden, weniger.

Eine weitere Methode zur Kernisolierung, die in Vorversuchen getestet wurde, bestand darin, die Zellen mittels 2 ml-Einmalspritzen aus Polyäthylen und No. 2-Kanülen durch mehrmaliges Aufziehen und schnelles Entleeren aufzubrechen. Diese Methode war genügend effektiv, wie sich bei der lichtmikroskopischen Kontrolle zeigte. Bei vielen Einzelansätzen, wie sie bei Translokationsstudien über 220 Minuten notwendig waren, war diese Methode allerdings zu zeitaufwendig. Außerdem war ein zeitparalleles Aufarbeiten der in 20-minütigen Abständen anfallenden Ansätze technisch nicht möglich.

Nach Vorversuchen mit einer Yeda-Press (Braun, Melsungen), mit der Williams und Gorski (1973) aus Rattenuteruszellen intakte Kerne isolieren konnten, ergab sich, daß bei manchen Zellarten, darunter auch bei Hühnereileiterzellen und Mammakarzinomzellen, die Kernisolierung gute Resultate erbrachte.

Andere Zellen, wie z.B. Hühnererythrozyten, passierten die Yeda-Press, ohne in genügend hohem Prozentsatz aufzubrechen.

Der große Nachteil dieses Geräts bei der Aufarbeitung vieler Einzelansätze bestand jedoch darin, daß nur eine Kammer zum Eingeben der Zellsuspension zur Verfügung stand und durch diese begrenzte Kapazität ein schnelles, paralleles Aufarbeiten der Zellen nicht möglich war.

Aus diesem Grund wurde in unserer Werkstatt ein Kernseparator gebaut, der über zehn Kammern verfügte und somit in einem Arbeitsgang die Aufschließung von maximal zehn Ansätzen ermöglichte. Die Anzahl der Kammern läßt sich außerdem durch das Anfügen neuer Kammern über eine Schnellkupplung erweitern (s. Abb. 4). Dies ist allerdings nicht unbegrenzt möglich, da es dann zu einem zu starken Druckabfall im System käme.

Die einzelnen Kammern stehen über Schnellkupplungen der Firma Pressluftzentrale mit dem gasführenden Aufhängerohr in Verbindung. Zwischen Aufhängerohr und Stickstoffflasche ist ein Druckventil eingeschaltet, mit dem der Druck im System bis auf maximal zulässige 40 atü eingestellt werden kann. Die Küken (Auslaßventile) wurden fertig von der Firma Völzer bezogen. Die Kammern des Geräts bestehen aus rostfreiem Chrom-Vanadium-Stahl; alle anderen Teile sind aus Messing oder Normal-Stahl hergestellt.

Die Kammern, die ein maximales Volumen von 5 ml aufnehmen können, sind einzeln zu füllen und hintereinander bei unter Druck stehendem System zu öffnen. Um mit dem Gerät zu arbeiten, brauchen nicht alle Kammern in das Aufhängerohr eingeklinkt zu werden. Ein nachträgliches Einklinken von Kammern ist jedoch nur dann möglich, wenn das System nicht unter Druck steht.

Für die Wirkung im Sinne einer Separierung der Kerne vom Cytosol lassen sich drei Ursachen angeben:

a. Nach der Äquilibrierungszeit hat sich gemäß dem herrschenden Druck zuvor gasförmiger Stickstoff in der Zelle gelöst.

Beim Öffnen des Nadelventils an der Unterseite der Kammer kommt es dann zu einem schlagartigen Druckabfall. Der Stickstoff geht dabei wieder in den gasförmigen Zustand über und zerreißt die Zellmembran. Der Anteil dieses Mechanismus an der zellaufschließenden Wirkung dürfte jedoch eher gering sein, da nach meinen Beobachtungen durch einen alleinigen Druckabfall die Zellen zumindest lichtmikroskopisch nicht geschädigt werden konnten.

b. Ein Effekt mechanischer Natur ist durch das Passieren der Zellsuspension durch das Nadelventil, d.h. der Stelle des geringsten Durchmessers und der stärksten Beschleunigung, gegeben. Die Zellen, die diese Stelle mit 30 atü passiert haben, wurden durch die dabei auftretenden Turbulenzen und membranzerreißenden Scherrkräfte aufgebrochen.

c. Beim Aufprall der Zellen auf den Boden des auffangenden Reagenzröhrchens kommt es zu einem weiteren zellaufschließenden mechanischen Effekt.

2. Lichtmikroskopische Kontrolle der Zellaufschließung

Parallelansätze, die mit den Ansätzen, die für die Durchführung der Scatchardplots bestimmt waren, im Wasserbad inkubiert wurden, passierten anschließend den Kernseparator und wurden danach zentrifugiert (s. Methoden VI. 3.).

Der Überstand, der der Cytoplasmafraktion entsprach, wurde lichtmikroskopisch mit Hilfe der Trypanblau-Methode auf Verunreinigungen in Form von Zellkernen und Zellbruchstücken kontrolliert. Das Kernsediment wurde ebenfalls mit der Trypanblau-Methode auf die vollständige Aufschließung der Zellen und die Separierung der Kerne von eventuellen Zellmembranbruchstükken hin untersucht.

3. Durchführung der Scatchardanalysen mit anschließender getrennter Auswertung der Bindung in Cytoplasma- und Kernfraktion

Die Zellisolierung und die sich daran anschließende Inkubation mit tritiiertem 17ß-Östradiol erfolgte wie unter Methoden I. und V. 2. beschrieben. Nach der 30-minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen jedoch in eine Cytoplasma- und Kernfraktion aufgetrennt wie folgt.

Nach der Überführung der Zellen aus den 25 ml- in 3 ml-Polyäthylenröhrchen (mit Pasteurpipetten) erfolgte eine 3-minütige Zentrifugation bei 2400 Upm (Beckman, Typ J-6).

Der Überstand wurde dann dekantiert und das Zellsediment mit jeweils 1 ml Tris-HCl-Puffer (10 mmol Tris-HCl/l; pH 7,4) aufgefüllt und sorgfältig resuspendiert. Mit Pasteurpipetten wurden dann die Zellsuspensionen in die 10 Kammern des Kernseparators überführt.

Die Kammern wurden dann in das Aufhängegestell eingeklinkt und nach dem Öffnen des Reduzierventils ein Druck von 30 atü eingestellt.

Nach der Äquilibrierungszeit von einer Minute wurden die Kammern hintereinander geöffnet und die aus den Küken herausschießende gemischte Kern-Cytoplasmasuspension quantitativ in 3 ml-Polyäthylenzentrifugenröhrchen aufgefangen. Nach dem Öffnen einer Kammer mußte diese wieder geschlossen werden, bevor die nächste Kammer geöffnet werden konnte, da es sonst zu einem zu großen Druckabfall im System gekommen wäre.

Die Polyäthylenröhrchen wurden dann über 10 Minuten bei 4200 Upm in einer J-6 Zentrifuge der Firma Beckman zentrifugiert.

Vom Überstand, der lichtmikroskopisch frei von Kernen war, wurden 500 µl mit Eppendorfpipetten vorsichtig abgenommen und als Cytoplasmafraktion in 3 ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

Der verbliebene Überstand wurde dekantiert und die dann in den Zentrifugenröhrchen verbliebene Kernfraktion in 2,5 ml einer 2,5 %igen Rinderserumalbuminlösung in MEM, Typ Eagle (pH 7,4) resuspendiert und anschließend wieder für 10 Minuten bei 4200 Upm zentrifugiert (J-6). Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, um das freie und unspezifisch gebundene 17ß-Östradiol zu entfernen.

Das Kernpellet wurde dann in 100 µl Aqua bidest. resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 500 µl Äthanol abs. inkubiert. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 2400 Upm (J-6) wurden 400 µl des Überstands mit einer Eppendorfpipette abgenommen und die Radioaktivität nach Zugabe von jeweils 10 ml einer Szintillationsflüssigkeit (Biofluor, NEN) in 25 ml-Szintillationsgefäßen in einem Szintillationszähler bestimmt (Packard, Typ 2650 oder Beckman, Typ LS 9000).

Das Entfernen des freien Hormons und des größten Teils der unspezifischen Bindung erfolgte in der Cytoplasmafraktion mit der Dextrankohle-Methode.

Das Dextrankohle-Reagenz wurde aus 3,75 g Norit A in 100 ml Puffer (pH 8,0), der aus 0,375 g Dextran in 10 mmol/l Tris-HCl-Puffer hergestellt wurde, angesetzt und dann über Nacht mit einem Magnetrührer bei 0 - 4° C suspendiert.

Am nächsten Tag wurde die Dextran-beschichtete Kohle dann dreimal in 150 ml des oben genannten Puffers suspendiert und durch 10-minütige Zentrifugation bei niedrigen Drehzahlen vom Puffer getrennt. Das gewaschene Kohlesediment wurde danach in 100 ml des Puffers aufgenommen und der Wert des pH's auf 8,0 eingestellt. Die so hergestellte Dextran-beschichtete Kohle konnte über Wochen bei einer Temperatur von 0 - 2° C aufbewahrt werden.

Bei der Dextrankohle-Methode wurden die 500 µl der Cytoplasmafraktion mit 500 µl des Dextrankohle-Reagenzes versetzt, gut durchmischt und bei 4° C 10 Minuten inkubiert.

Diese Ansätze wurden dann über 3 Minuten bei 2400 Upm in der J-6 Zentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden 800 µl des klaren Überstandes mit einer Eppendorfpipette in 25 ml-Polyäthylenröhrchen überführt, mit 10 ml der Szintillationsflüssigkeit wie oben durchmischt und in einem Szintillationszähler die Radioaktivität bestimmt.

4. Parallelansätze mit Zellen ohne Steroidrezeptoren

Als Versuchsobjekt dienten in diesen Versuchen Hühnererythrozyten, da diese keinen Östrogenrezeptor besitzen. Ihr weiterer Vorteil war das Vorhandensein eines Zellkerns, so daß sie auch als Vergleichsobjekt zu den Translokationsversuchen dienen konnten.

Die Gewinnung der Erythrozyten geschah parallel zur Entnahme des Hühnereileiters (s. Methode I.).

Nach der Punktion der Vena cava in der geöffneten Bauchhöhle wurden ca. 10 ml durch vorherige intraperitoneale Liquemin-Injektion ungerinnbar gemachtes Blut entnommen, das dann mit dem gleichen Volumen Krebs-Ringer Hydrogenkarbonatpuffer (pH 7,4) durchmischt wurde.

Jeweils 4 ml Lymhocyte Separation Medium wurden nun in 10 ml-Glaszentrifugenröhrchen gegeben und mit dem gleichem Volumen an verdünntem Blut überschichtet. Diese Zentrifugenröhrchen wurden dann über 20 Minuten bei 3300 Upm und 4° C zentrifugiert (Heraeus Christ, Typ UJ-3).

Nach dem Durchstechen der sich über dem Medium befindlichen Leukozytenschicht konnten mit einer Pasteurpipette vom Boden des Reagenzglases die gereinigten Hühnererythrozyten abgesammelt werden. Diese wurden dann dreimal in Krebs-Ringer Hydrogenkarbonatpuffer resuspendiert und bei 1000 Upm über 3 Minuten bei Raumtemperatur wieder abzentrifugiert (Heraeus Christ, Typ Labofuge I).

Aus dem dann resultierenden endgültigen Zellsediment wurde eine 10 %ige Zellsuspension hergestellt, die auf ihre morphologische Intaktheit im Lichtmikroskop mit der Trypanblau-Methode überprüft wurde.

Mit dieser Zellsuspension wurden analog zu Methoden VI. 3. Parallelansätze zu den Eileiterzellen hergestellt, die unter den gleichen Verhältnissen wie diese weiterverarbeitet wurden.

Im Gegensatz zu den Eileiterzellen (s. Methoden VI. 3.) mußten die Erythrozyten jedoch vor dem Aufschließungsschritt in einer 1,5 mmol/l $MgCl_2$-Lösung in Aqua bidest. und nicht in dem oben beschriebenen Tris-HCl Puffer aufgenommen werden. Durch dieses hypotone Medium wurde der Aufschließungseffekt des Kernseparators unterstützt. Dies war deshalb nötig, da der Kernseparator, wie oben schon erwähnt wurde, nur bedingt zum Aufschluß von Hühnererythrozyten geeignet war.

VII. Translokationsstudien an Hühnereileiterzellen

Nach der Herstellung der 10 %igen Eileiterzellsuspension (s. I.) in einem Medium aus foetalem Rinderserum und MEM, Typ Eagle (1/1, v/v; pH 7,4) wurden für jeweils 11 Zeitpunkte (mit 20-minütigem Abstand zueinander) je 6 Einzelproben angesetzt, von denen 3 nur mit tritiiertem 17ß-Östradiol und 3 mit tritiiertem 17ß-Östradiol und 1 x 10^{-6} mol DES/l als Kompetitor inkubiert wurden.

Die Konzentration des 17ß-Östradiols war für alle Ansätze eines Versuchs gleich hoch. Sie bewegte sich je nach Versuch zwischen 0,5 und 10 nmol/l.

Die 66 insgesamt resultierenden Ansätze zu je 1 ml Zellsuspension wurden in gasdichten 25 ml-Polyäthylenröhrchen, die eine Carbogenatmosphäre enthielten, in einem Schüttelbad bei 37° C (Schüttelfrequenz 60/min., Amplitude 2,5 cm) inkubiert.

Nach jeweils genau 20 Minuten wurden je 3 Proben mit und 3 Proben ohne Kompetitor aus dem Wasserbad entnommen, die Zellsuspension mit Pasteurpipetten in 3 ml-Polyäthylenzentrifugenröhrchen überführt und bei 2400 Upm 3 Minuten zentrifugiert (J-6 Zentrifuge).

Dann wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 1 ml Tris-HCl Puffer (pH 7,4) wie unter Methoden VI. 3. beschrieben resuspendiert.

Die anschließende Aufschließung im Kernseparator und die getrennte Auswertung der Bindung im Cytoplasma- und im Kernkompartiment erfolgte wie unter VI. 3. beschrieben.

VIII. Hemmversuche mit Puromycin und α-Amanitin

1. Theoretische Grundlagen

Um Einblick in die Neusynthese bzw. das Wiederauffüllen des cytoplasmatischen Rezeptorpools durch Rezeptorrecycling oder durch das Processing eines inaktiven Rezeptorvorläufers zu bekommen, boten sich verschiedene Hemmstoffe der Proteinsynthese an.

Dabei handelte es sich um α-Amanitin, ein Zellgift aus der Pilzart Amanita phalloides, das spezifisch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II und dadurch die Transkription von nichtnucleolärer RNA hemmt (Lindell et al., 1970; Träger, 1977). α-Amanitin ist ein bicyclisches Oktapeptid atypischer Aminosäuren, das nicht durch Peptidasen gespalten werden kann und dessen Wirkung sehr schnell nach Inkubationsbeginn einsetzt.

Im Gegensatz dazu hemmt Puromycin, ein Stoff aus der Substanzklasse der Antibiotika, die m-RNA-abhängige Proteinsynthese an den Ribosomen und damit die Translation von bereits vor Beginn des Hemmversuchs in der Zelle vorhandener m-RNA (Hartmann et al., 1968; Allen und Zamecnik, 1962).

2. Translokationsstudien an Hühnereileiterzellen über eine Inkubationszeit von 220 Minuten

Die Zellisolierung und die Inkubation mit tritiiertem 17ß-Östradiol liefen wie unter Methoden I. und VII. beschrieben ab mit dem Unterschied, daß alle 20 Minuten 8 Einzelansätze entnommen werden mußten.

Von diesen 8 Proben waren 4 Proben mit α-Amanitin inkubiert worden (bzw. mit Puromycin). Davon waren 2 Proben nur mit tritiiertem 17ß-Östradiol und 2 Proben mit tritiiertem 17ß-Östradiol und DES als Kompetitor inkubiert worden.

	Puromycin bzw. α-Amanitin -	+
E_2	DOPPELWERTE	DOPPELWERTE
E_2 + DES	DOPPELWERTE	DOPPELWERTE

Den anderen 4 Ansätzen wurde zusätzlich je nach Versuch entweder α-Amanitin oder Puromycin in für die Hemmung wirksamen Konzentrationen hinzugegeben.

Bei α-Amanitin betrug die hemmwirksame Dosis 1 ng/ml Zellsuspension. Dies ist die Konzentration, bei der in den von Lindell et al. durchgeführten Versuchen die Aktivität der RNA-Polymerase II nahezu bei Null lag (Lindell et al., 1970). Eine Erhöhung dieser Konzentration führte in meinen Versuchen zu keiner stärkeren Abnahme der Proteinsyntheseraten.

Puromycin wurde in Konzentrationen bis zu 300 µg/ml Zellsuspension eingesetzt. In Parallelansätzen mit höheren Konzentrationen konnte gezeigt werden, daß eine weitere Erhöhung der Konzentrationen, unter den in meinen Versuchen gegebenen Verhältnissen, nicht zu einer stärkeren Hemmung der Rezeptorsynthese führte.

Das Entfernen des freien Hormons und der unspezifischen Bindung, sowie das Zählen der Radioaktivität erfolgte, wie unter Methoden VII. beschrieben wurde.

IX. Anwendung des entwickelten Ganzzellassays auf Mammakarzinome mit getrennter Auswertung der Bindung in Cytoplasma- und Kernfraktion

Nach der Aufarbeitung des Tumors und der Isolierung der Zellen (s. III.) erfolgte die Inkubation der meist aus Mangel an Tumormaterial nur 2 - 3 %igen Zellsuspension, die in einem Medium aus foetalem Kälberserum und MEM (1/1, v/v; pH 7,4) hergestellt worden war. Diese Inkubation fand bei 37° C über 30 Minuten im Wasserbad (Schüttelfrequenz 120/min, Amplitude 2,5 cm) statt (analog zu V. 2.).

Der Separierungsschritt und der darauf folgende Waschvorgang zur Entfernung des freien und des unspezifisch gebundenen Hormons erfolgten analog zu Methoden VII. 3.

Die so aus einem Tumor gewonnenen Bindungsdaten wurden mit den Ergebnissen, die mit Hilfe der anderen Methoden aus demselben Tumor ermittelt worden waren, verglichen. Bei diesen Methoden handelte es sich um die am Tumorcytosol angewandte Dextrankohle-Methode (modifiziert nach Korenman, 1968a, 1968b, 1970) und um die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (modifiziert nach Toft und Gorski, 1966).

Einzelheiten über die Dextrankohle-Methode können in den Arbeiten von McGuire et al. (1975a, 1975b), Wittliff und Savlov (1975), Mester und Baulieu (1975), Jensen und DeSombre (1977) und vielen anderen Autoren nachgelesen werden. Die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation wurde in der Modifikation nach Bojar (1980) durchgeführt.

ERGEBNISSE

I. Ausbeute und Intaktheit der isolierten Zellen

1. Hühnereileiterzellen

Durch die Inkubation des Hühnereileiters mit Kollagenase in Kombination mit einem mechanischen Aufschließungsschritt konnten ausreichende Mengen an isolierten Zellen gewonnen werden, deren Zahl auch für die Durchführung von Translokationsversuchen mit insgesamt 88 Ansätzen zu je 1 ml Zellsuspension ausreichte.

Die Inkubation des Gewebes mit weiteren Enzymzusätzen (DNAase 5 mg/g Gewebefeuchtgewicht; Elastase 5 mg/g Gewebefeuchtgewicht), die unter anderem eine Bildung von schleimigen Aggregaten aus der DNA aufgebrochener Zellen vermeiden helfen sollte, führte zu keiner Erhöhung der Zellausbeute. Außerdem zeigten die Zellen nach der enzymatischen Inkubation teilweise eine geringere Viabilität. Auch die Verwendung von Pronase (0,5 %ig) und von Trypsin (0,35 %ig) konnte die Ausbeuterate an Zellen aus dem Hühnereileiter nicht steigern.

Die Ausbeute an isolierten Zellen aus dem Hühnereileiter betrug nach der Kollagenase-Inkubation 35 - 40 % des Feuchtgewichts, d.h. aus einem ca. 25 g schweren Eileiter konnten 10 g Zellen isoliert werden.

Die Zellzahl errechnete sich zu $7{,}70 \times 10^8$ Zellen/g Protein der Zellsuspension (ermittelt mit Hilfe der Biuretmethode, s. Methoden IV.) bzw. $1{,}54 \times 10^8$ Zellen/g Feuchtgewicht.

Bei lichtmikroskopischer Kontrolle zeigte es sich, daß Zellbruchstücke und Verunreinigungen weitgehend durch das mehrmalige Waschen der Zellen in MEM eliminiert werden konnten. Die

Zellen lagen zum größten Teil in isolierter Form vor; noch nicht vollständig aufgeschlossene Zellverbände von 8 - 15 zusammenhängenden Zellen konnten weitgehend durch Filtration der Suspension durch Gewebe mit 150 µm Maschenweite entfernt werden, so daß schließlich ca. 90 % der Zellen als Einzelzellen und die restlichen 10 % in Aggregaten von 2 - 5 Zellen vorlagen.

Schon bei lichtmikroskopischer Betrachtung fiel auf, daß ca. 5 % der Zellen Zilien trugen, die auch bei den isolierten Zellen noch in koordinierter, metachroner Bewegung waren. Dies ist als ein Hinweis auf die funktionelle Intaktheit der Eileiterzellen nach der Isolierung und Aufnahme in das MEM-Medium zu verstehen.

Nach Trypanblau-Zugabe färbten sich bei 5 % der Zellen die Zellkerne an. Die Viabilität betrug somit 95 %.

Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten die morphologische Intaktheit der Zellen und ihrer Organellen und erlaubten weiterhin eine Unterteilung der Zellpopulation in vier verschiedene Subtypen, deren prozentuales Vorkommen in der endgültigen Zellsuspension stark unterschiedlich war (s. Abb. 5 A - D):

1. Drüsenzellen
2. Gobletzellen (= Becherzellen, s. Bucher, 1980)
3. Epithelzellen mit Zilienbesatz
4. Muskelzellen

Dies stimmt überein mit den Untersuchungen, die von Brant und Nalbandov (1956) am ganzen Eileiter gemacht worden sind. Auch Ljungkwist (1967) konnte diese Befunde bestätigen. Nach diesen Autoren alternieren an der Oberfläche des Eileiters, die zum Lumen hin gewandt ist, Epithelzellen mit Zilienbesatz mit sogenannten Gobletzellen. In der Tiefe des Eileiterstromas liegen neben glatten Muskelzellen tubuläre Drüsen.

Nach O'Malley et al. (1969) produzieren die Gobletzellen nach Progesteronapplikation Avidin und die Drüsenzellen nach Östrogengabe Ovalbumin.

Auf den elektronenmikroskopischen Bildern fallen ferner in großer Anzahl vorhandene, sich dunkel darstellende, granulahaltige Vakuolen auf, die auch bei lichtmikroskopischer Betrachtung in nahezu allen Zellen zu sehen waren. Diese Vakuolen scheinen von den Drüsenzellen im Sinne einer apokrinen Sekretion abgegeben zu werden. Sie sind auch isoliert in der Zellsuspension zu finden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, daß es sich hierbei nicht, wie man aus den lichtmikroskopischen Aufnahmen annehmen könnte, um eine fettige, vakuoläre Degeneration, wie sie als Vorstufe des Zelltods auftreten kann, handelt. Nach O'Malleys (1969) fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen handelt es sich dabei um Ovalbumingranula, die sich in kondensierenden Vakuolen bilden.

Mit dem Einbau von (U-^{14}C) L-Leucin wurde der Nachweis der funktionellen Intaktheit geführt. Dazu wurden Ansätze der Zellsuspension sofort nach der Isolierung und, um die Intaktheit der Zellen nach einer längeren Inkubationszeit zu kontrollieren, nach 6 Stunden mit 250 µCi (U-^{14}C) L-Leucin pro Ansatz über 1 Stunde bei 37° C inkubiert und die Reaktion mit Perchlorsäure gestoppt (s. Methoden II. 2.).

Die Zellen, die sofort nach der Zellisolierung mit (U-^{14}C) L-Leucin inkubiert worden waren, hatten 10,22 ± 0,84 nmol Leucin/ml 5 %ige Zellsuspension/h eingebaut (n = 8).

Nach der 6-stündigen Inkubation der Ansätze betrug die Einbaurate 10,66 ± 1,20 nmol Leucin/ml 5 %ige Zellsuspension/h (n = 8). Die Einbaurate hatte sich also innerhalb der methodenbedingten Schwankungsbreite nicht geändert; die Zellen waren auch nach der Inkubation funktionell intakt.

Parallel zu den Ansätzen, die über 6 Stunden inkubiert wurden, liefen Ansätze, die mit α-Amanitin oder mit Puromycin inkubiert wurden. Die Einbaurate der α-Amanitin-gehemmten Zellen lag um

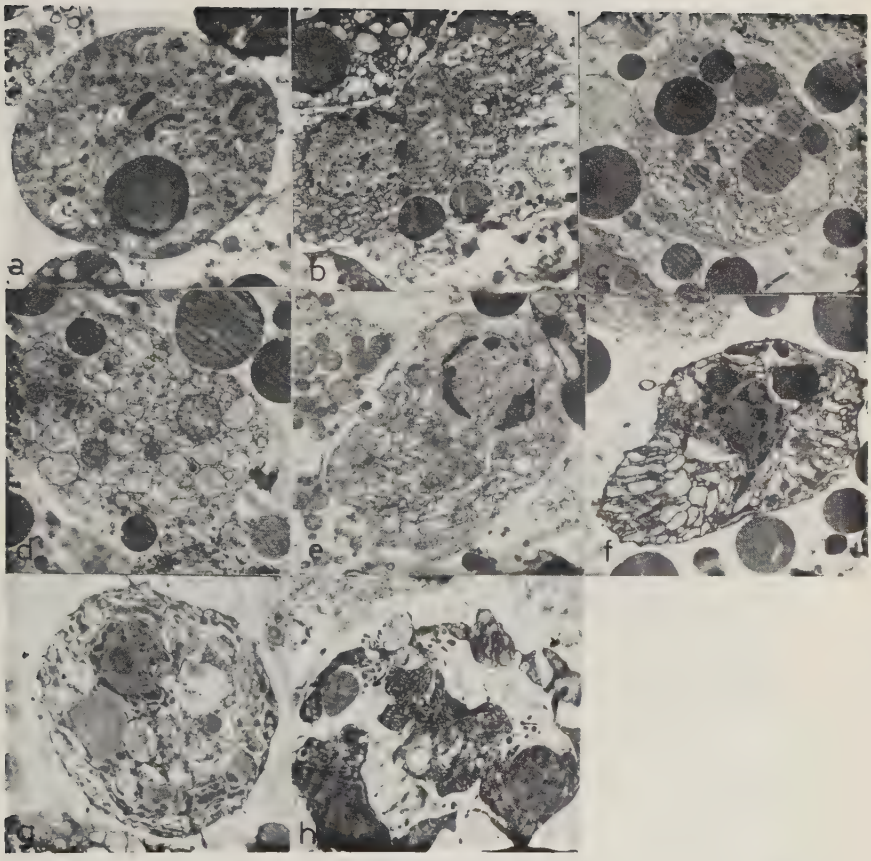


Abb. 5 A: Diese elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Vergrößerung 2000fach) zeigen die zunehmende sekretorische Aktivität von isolierten, tubulären Drüsenzellen des Hühnereileiters. Der hier abgebildete Zelltyp war der bei weitem häufigste in der Zellsuspension. Die Mitochondrien sind funktionell geschwollen und reich strukturiert (b - h), im Gegensatz zu den in Abb. 5 C wiedergegebenen Mitochondrien der metabolisch weniger aktiven Epithelzellen. Das rauhe endoplasmatische Retikulum schwillt zunehmend von a bis h an. Es bilden sich in den Zellen dunkle, z.T. Granula enthaltende Vakuolen, die auch im umgebenden Medium zu sehen sind. In Teil h sieht man eine Zelle mit extrem geschwollenem FR. Diese Zelle, die sich offenbar in einem Stadium der metabolischen Erschöpfung befindet, ist aber noch intakt, da sich die Zellmembran, soweit sichtbar, lückenlos darstellt.

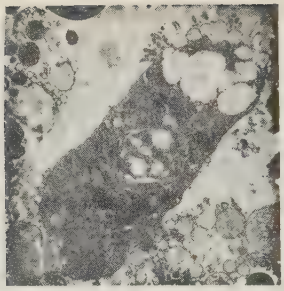
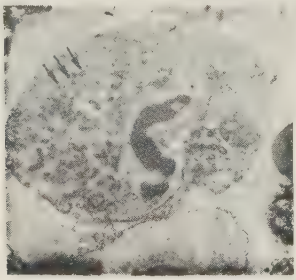


Abb. 5 B: Diese Abbildung zeigt eine Gobletzelle, die zum Typ der Becherzellen gehört. Gut erkennbar ist der basal gelegene Zellkern und der zentral gelegene Golgi-Apparat. Der Inhalt der apikal gelegenen Vakuolen ist deutlich unterschiedlich von dem der tubulären Drüsenzellen.



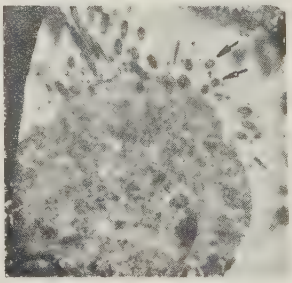


Abb. 5 C: Hier sind zwei Oberflächenepithelzellen mit Zilienbesatz zu erkennen. Die 9 x 2 + 2 Struktur ist bei den in der ersten Zelle angeschnittenen Kinozilien bei entsprechender Nachvergrößerung zu sehen (s. Pfeile).

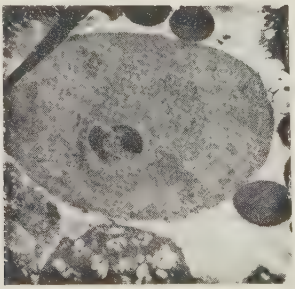


Abb 5 D: Die hier abgebildete Zelle ist eine glatte Muskelzelle. Man erkennt die in mehreren Feldern angeordneten kontraktilen Fibrillen. Dieser Zelltyp war extrem selten in der Zellsuspension.

24 ± 3 % (n = 8), die der Puromycin-gehemmten Zellen um 92 ± 7 % (n = 8) niedriger als bei den Zellen ohne Hemmsubstanzen. Puromycin ist also ein sehr wirksamer Hemmstoff aller in der Zelle ablaufender Proteinsynthesen. Auch nach einer Inkubation von 6 Stunden Dauer ist der Hemmeffekt von α-Amanitin und Puromycin auf die Proteinsynthese noch vorhanden.

Die Viabilität der Zellen (auf 1000 ausgezählte Zellen bezogen) betrug auch nach der 6-stündigen Inkubation 92 % (ermittelt mit der Trypanblau-Methode). Gegenüber dem initialen Wert von 95 % hat also eine vernachlässigbare Abnahme der Viabilität während der Inkubationszeit stattgefunden.

Es läßt sich allerdings nicht völlig ausschließen, daß eine größere Anzahl an Zellen zugrunde gegangen ist, ohne daß man von ihnen nach der Inkubation irgendwelche Überreste sehen könnte. Die gleiche Einbaurate von (U-^{14}C) L-Leucin vor und nach der Inkubation spricht aber dagegen.

2. Mammakarzinomzellen

Mit dem unter Methoden III. beschriebenen Verfahren ergab sich eine Zellausbeute von 4 - 5 % des Tumorfeuchtgewichts. Das entspricht einer Ausbeute von etwa 0,3 g aus einem 7 g wiegenden Tumor. Diese Ausbeute reichte in Hinblick auf einen geplanten Scatchardplot mit zumindest 4 verschiedenen Konzentrationen an tritiiertem 17ß-Östradiol bei kleineren Tumoren und Probeexcisionen oft nicht aus.

Die Methode C hatte, neben der etwa gleich großen Zellausbeute wie Methode B, den Vorteil der größeren Flexibilität bei der zeitlichen Planung, da die Ausführung des Assays nicht sofort am Tag der Tumorentnahme erfolgen mußte, sondern dazwischen eine längere Inkubationszeit (10 Stunden) lag. Beide Methoden führten zu einer etwa 10 %igen Zellausbeute (je nach histologischem Typ des Tumors).

Bei der Anwendung der Methoden B und C betrug die Zellausbeute 9,37 x 10^8 Zellen/g Protein der Zellsuspension, entsprechend

$0{,}54 \times 10^8$ Zellen/g Tumorgewebe.

Da es zwischen der mit Methode B und C erzielten Ausbeute und der Viabilität der Zellen keine erkennbaren Unterschiede gab, konnte auf eine sofortige Verarbeitung des Tumors im Operationssaal verzichtet werden, unter der Voraussetzung, daß eine entsprechende Kühlung des Gewebes während des Transports (in 0,9 %iger NaCl-Lösung) vorgenommen wurde.

Wie die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten (s. Abb. 6), bestand die 2 %ige Zellsuspension aus hinsichtlich der Zell- und Kerngröße stark heterogenen Zellen.

Die mit Hilfe der Trypanblau-Methode ermittelte Viabilität dieser Zellen betrug ca. 95%.

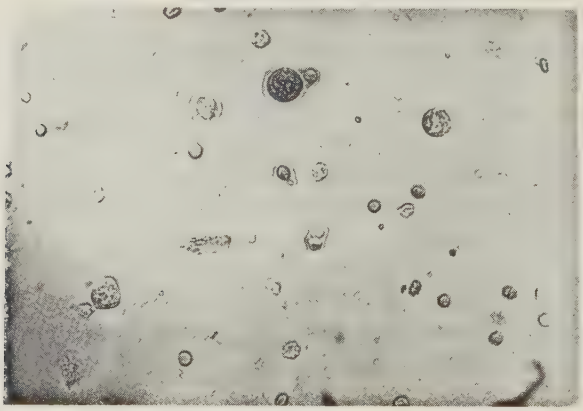


Abb. 6: Morphologisch stark heterogene Mammakarzinomzellsuspension (Vergrößerung 1 : 150). Die Größe der morphologisch intakten Zellen geht von 10 bis 70 µm. Zum Vergleich bieten sich die in der Abbildung zu sehenden Erythrozyten mit ihrer Größe von 7 µm an.

II. Östrogenrezeptorbestimmung nach Scatchard an isolierten, intakten Hühnereileiterzellen

1. Ganzzellassay ohne Auftrennung in Kern- und Cytoplasmafraktion

Nach der Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen an tritiiertem 17ß-Östradiol erfolgte die Entfernung des freien Hormons durch ein Resuspendieren der Zellen in einem Medium aus 2,5 %iger Rinderserumalbumin-Lösung in MEM, Typ Eagle (pH 7,4). Dieser Vogang wurde bei Methoden V. 2. beschrieben.

Dieses Medium erwies sich im Vergleich zu anderen getesteten Medien in Hinblick auf die Viabilität der Zellen und auch in Bezug auf die nach dem Waschvorgang verbliebene unspezifische Bindung als qualitativ zumindest gleichwertig, in der Anwendung aber als leichter und zeitsparender als andere verwendete Medien.

Nach der Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard (1949) wurden die scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d's) bzw. die scheinbaren Assoziationskonstanten (K_a's) aus der Steigung der sich ergebenden Geraden errechnet. Die maximalen Bindungskapazitäten (MBC's) der Rezeptoren wurden in mol/l aus den Schnittpunkten der Geraden mit der Abszisse abgelesen.

Der Verlauf der aufgetragenen Werte ergab eine Gerade, die nach der Methode der kleinsten Quadrate mit dem Programm eines Wang-Rechners ermittelt wurde (Martin et al., 1975).

In Abbildung 7 ist ein aus 9 reproduzierbaren Versuchen repräsentatives Experiment wiedergegeben. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

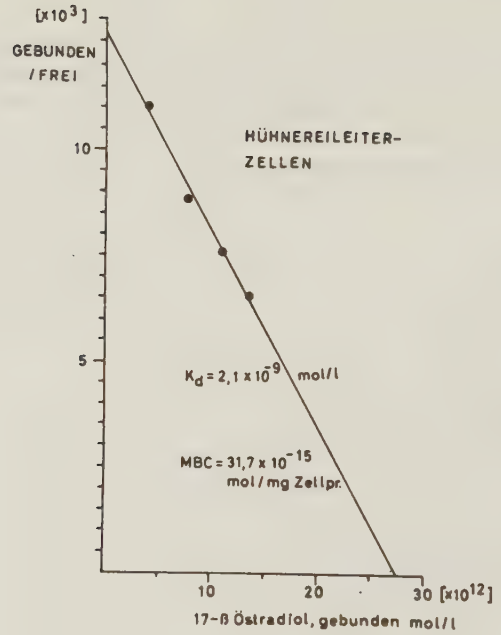


Abb. 7: Repräsentativer Ganzzellscatchardplot von isolierten, intakten Hühnereileiterzellen

2. Ganzzellassay mit Auftrennung in Kern- und Cytoplasmafraktion

Nach der Inkubation, die wie unter Methoden V. 2. beschrieben ablief, erfolgte die Auftrennung der Zellen in eine Cytoplasma- und eine Kernfraktion (s. Methoden VI.). Die Entfernung des freien Hormons wurde getrennt im Cytoplasma mit der Dextran-kohle-Methode und in der Kernfraktion mit 2,5 %igem Rinderserumalbumin in MEM (pH 7,4) durchgeführt. Es wurden vorher mit unbefriedigendem Ergebnis verschiedene andere Medien bei der Kernfraktion getestet. Bei diesen anderen Medien handelte es sich um Zitratpuffer verschiedener Konzentrationen (von 2,5 %ig bis 10 %ig) mit einem pH von 4,0, in dem die Zellen dreimal gewaschen wurden. Weiterhin wurden Triton-X-100 Medien (0,25 % in MEM, Typ Eagle) zur Entfernung der unspezifischen Bindung getestet und/oder die Zellen durch 10 oder 20 %ige Saccharose-Gradienten zentrifugiert.

Die Auftragung der Bindungsdaten erfolgte wieder nach Scatchard (s. Abb. 8).

Der durch die verschiedenen 17ß-Östradiolkonzentrationen gegebene Graph hatte nicht die Form einer Geraden, sondern zeigte im Cytoplasma eine nach oben und in der Kernfraktion eine nach unten konvexe Form. Die Auswertung nicht-linearer Scatchardplots ist naturgemäß schwierig. Daher konnten die Dissoziationskonstanten (K_d's) und die MBC's nur angenähert errechnet werden (s. Tabelle 1).

Dies erfolgte durch die Konstruktion einer Geraden, die sich in möglichst kleinen Abständen zu den Konzentrationspunkten des Scatchardplots hielt. Diese Gerade wurde wieder nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate (Martin et al., 1975) ermittelt. Dabei mußten die Geraden der Cytoplasma- und der Kernfraktion parallel zueinander verlaufen, da bei gleichen Inkubationsbedingungen in beiden Kompartimenten keine Änderung der Rezeptoraffinität zum Hormon eintreten kann (dies gilt unter der Voraussetzung, daß die in beiden Kompartimenten erfaßten Rezeptoren identisch sind).

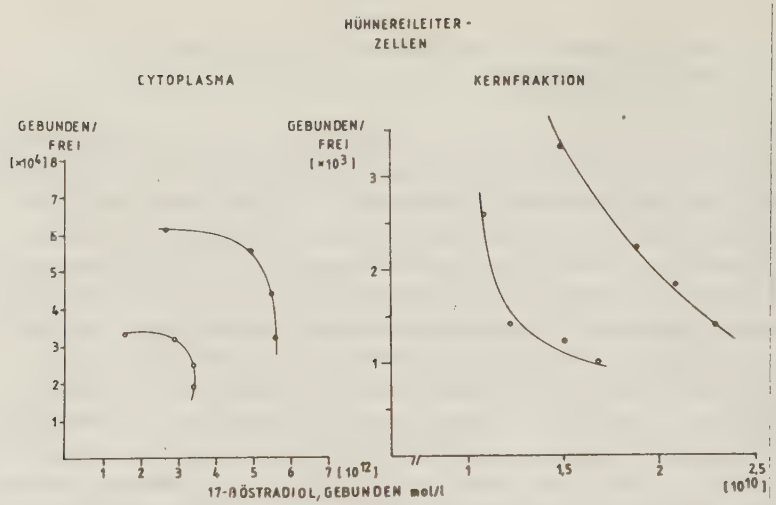


Abb. 8: Typischer Ganzzellscatchardplot von isolierten Hühnereileiterzellen mit getrennter Auswertung der Bindung in Cytoplasma- und Kernfraktion (●——●). Zusätzlich ist der Verlauf des Scatchardplots nach einer einmaligen Inkubation der Zellen mit 1 x 10^{-8} mol DES/l wiedergegeben (o——o).

Für die so errechneten scheinbaren Dissoziationskonstanten ergab sich in der Cytoplasmafraktion ein mittlerer Wert von 3,6 ($\pm$ 2,5 STDM*) x 10^{-9} mol/l, entsprechend einer scheinbaren Assoziationskonstanten von 2,8 ($\pm$ 1,9 STDM) x 10^{8} l/mol (s. Tabelle 1).

In der Kernfraktion ergab sich eine scheinbare Dissoziationskonstante von 4,0 ($\pm$ 1,4 STDM) x 10^{-9} mol/l, entsprechend einer scheinbaren Assoziationskonstanten von 2,5 ($\pm$ 0,6 STDM) x 10^{8} l/mol.

Die in den Zellen ohne Auftrennung genau errechnete mittlere K_d von 2,8 ($\pm$ 1,6 STDM) x 10^{-9} mol/l (s. Tabelle 1) liegt also im gleichen Bereich wie die nach der Auftrennung ermittelte.

STDM* = Standardabweichung des Mittelwerts

Die maximalen Bindungskapazitäten (MBC's) nach der Auftrennung in Cytoplasma- und Kernfraktion konnten in gleicher Weise wie die scheinbaren Dissoziationskonstanten nur angenähert errechnet werden. Es ergab sich dann eine MBC von 38,1 (± 8,0 STDM) fmol/mg Zellprotein in der Kernfraktion und von 3,6 (± 5,0 STDM) fmol/mg Zellprotein im Cytoplasma. Die maximale Bindungskapazität der gesamten Zellen betrug also 41,7 (± 13,0 STDM) fmol/mg Zellprotein.

Im Vergleich dazu betrug die MBC, die von Hühnereileiterzellen ohne getrennte Auswertung ermittelt wurde, 28,1 (± 4,2 STDM) fmol/mg Zellprotein. Die sich ergebende Differenz zwischen diesen beiden Werten ist nicht signifikant, da bei den Versuchen mit den aufgetrennten Zellen die ermittelten Werte eher Schätzwerte darstellen und die statistische Auswertung der Ergebnisse eine hohe Standardabweichung aufweist.

	NICHT-AUFGETR.		AUFGETRENNT			
			CYTOPLASMA		KERNFRAKTION	
	MBC ($\times 10^{-15}$ mol/mg Protein)	K_d ($\times 10^{-9}$ mol/l)	MBC ($\times 10^{-15}$ mol/mg Protein)	K_d ($\times 10^{-9}$ mol/l)	MBC ($\times 10^{-15}$ mol/mg Protein)	K_d ($\times 10^{-9}$ mol/l)
	22,8	3,4	3,0	5,9	30,6	4,7
	31,7	2,3	1,4	2,1	43,0	3,7
	30,0	3,9	ø	ø	46,6	4,8
	24,6	1,4	2,9	3,5	35,8	5,0
	26,5	6,3	0,7	9,7	22,4	1,6
	25,2	1,3	4,4	3,8	45,0	4,1
	33,1	2,3	2,2	1,3	35,5	4,3
	34,0	2,7	16,5	3,6	38,0	5,8
	24,6	1,2	1,0	2,3	45,7	2,0
$\bar{X}$ =	28,1 ±	2,8 ±	3,6 ±	3,6 ±	38,1 ±	4,0 ±
±STDM	4,2	1,6	5,0	2,5	8,0	1,4

Tab. 1: Diese Tabelle faßt die maximalen Bindungskapazitäten (MBC's) und die scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d's) aller an Hühnereileiterzellen durchgeführten Ganzzellscatchardplots mit und ohne Auftrennung zusammen.

3. Negativkontrollen mit Hühnererythrozyten

Die Herstellung der nicht-rezeptorhaltigen Erythrozytensuspension erfolgte, wie im Kapitel Methoden VI. 4. beschrieben wurde.

Die Erythrozyten wurden dann in einer 10 %igen Zellsuspension (w/v) parallel zu den Eileiterzellen mit den gleichen Konzentrationen an tritiiertem 17ß-Östradiol inkubiert und wie diese anschließend im Kernseparator in eine Cytoplasma- und eine Kernfraktion aufgetrennt.

Die Konzentration des total in den Zellen gebundenen tritiierten 17ß-Östradiols wurde zusammen mit der Konzentration des gebundenen 17ß-Östradiols nach der Kompetition mit DES gegen die Konzentration des eingesetzten tritiierten 17ß-Östradiols aufgetragen, so daß sich die spezifische Bindung als Differenz zwischen der totalen und der kompetierten Bindung ergab (s. Abb. 9).

Die unspezifische Bindung im Cytoplasma steigt direkt proportional zur eingesetzten Hormonkonzentration an. Ihre, im Vergleich dazu, stärkere Zunahme in der Kernfraktion ist bei niedrigen Hormonkonzentrationen stärker ausgeprägt als bei höheren Hormonkonzentrationen.

Abbildung 9 läßt weiterhin erkennen, daß sowohl in der Kernfraktion als auch im Cytoplasma keine spezifische Bindung bei eingesetzten tritiierten 17ß-Östradiolkonzentrationen von 0,5 bis 15 nmol/l vorhanden ist.

Ein Rezeptor ist in diesem Zellmodell bei Anwendung der Ganzzellassay-Methode also nicht nachweisbar. Die Ergebnisse der Ganzzellscatchardplots und der Translokationsstudien beim Hühnereileiter und beim Mammakarzinom beruhen also nicht auf einem methodenbedingten Artefakt, sondern auf einer Hormon-Rezeptorbindung.

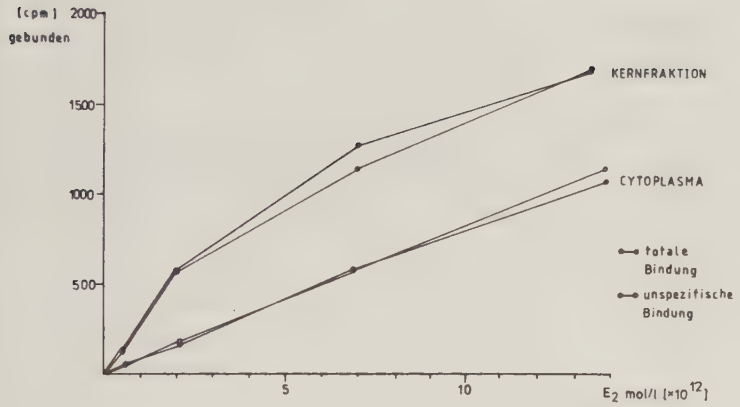


Abb. 9: Auftragung der totalen und der unspezifischen Bindung von tritiiertem 17ß-Östradiol (E_2) in Hühnererythrozyten in Abhängigkeit von der eingesetzten Hormonkonzentration. Die unspezifische Bindung wurde durch Kompetition mit DES bestimmt.

III. Ganzzellassay von Hühnereileiterzellen nach vorheriger einmaliger DES-Inkubation

1. Durchführung ohne Auftrennung der Zellen in eine Cytoplasma- und Kernfraktion

Wie bei Methoden V. 3. beschrieben, wurde vor der eigentlichen Titration der Östradiolrezeptoren mit tritiiertem 17ß-Östradiol und der Auswertung der Bindungsdaten nach Scatchard (1949) bei diesen Versuchen eine Vorinkubation der Zellen mit verschieden hohen Konzentrationen DES (1 und 10 nmol DES/l) vorgenommen. Nach dieser 10-minütigen Inkubation dauerten die weiteren Arbeitsschritte bis zum Beginn der Hauptinkubation mit tritiiertem 17ß-Östradiol insgesamt 30 Minuten. Das eventuell noch im Zellpellet befindliche freie DES wurde durch zweimalige Resuspension (in jeweils 10 ml MEM) mit anschließender Zentrifugation der Zellen entfernt.

Die Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard zeigte, wie bei den Ganzzellscatchardanalysen ohne Vorbeladung, einen monophasischen Verlauf in Form einer Geraden, entsprechend dem Vorhandensein nur einer Klasse von Bindungsstellen.

Die maximale Bindunskapazität nahm, wie man Abbildung 10 entnehmen kann, bei der Vorbeladung der Zellen mit 1×10^{-9} mol DES/l ab.

Bei der Vorinkubation mit 1×10^{-8} mol DES/l war diese Abnahme der maximalen Bindungskapazität noch größer. Bezogen auf die zehnmal höhere Konzentration DES verwundert es, daß diese Abnahme auf ca. zwei Drittel des Ausgangswerts ohne Hemmung nicht wesentlich größer als die nach der Beladung mit 1×10^{-9} mol DES/l war. Die mittlere Abnahme der maximalen Bindungskapazität betrug nach der 1 nmol DES/l Vorbeladung 18,2 $\pm$ 0,6 STDM % (n = 3) und nach der 1×10^{-8} mol DES/l Vorbeladung 37,0 $\pm$ 1,3 STDM % (n = 3), bezogen auf die maximale Bindungskapazität der Zellen ohne Vorbeladung.

Die scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d's) änderten sich durch die Vorinkubation im Rahmen der methodenbedingten Schwankungsbreite nicht. Dies war auch nicht zu erwarten, da sich die Affinität des Rezeptors zum Hormon bei dem Vorliegen einer einfachen Äquilibration von unabhängigen Bindungsstellen nicht mit der Beladung eines Teils der Rezeptoren ändert. Die K_d-Identität ist auch ein Beweis dafür, daß das freie DES nach der Vorbeladung (vor Beginn der Hauptinkubation) restlos entfernt wurde und keine Isotopendilution des tritiierten 17ß-Östradiols erfolgte.

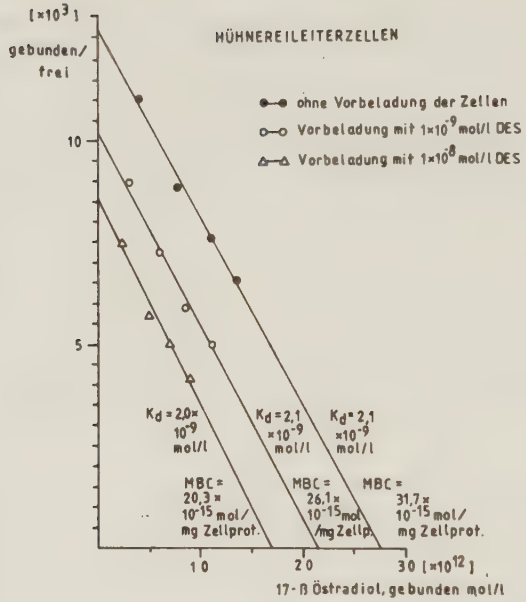


Abb. 10: Diese Abbildung zeigt den typischen Verlauf des Ganzzellscatchardplots nach einer 10-minütigen, einmaligen Vorinkubation der Zellen mit 1 x 10^{-9} bzw. 1 x 10^{-8} mol DES/l. Als Bezugsgerade ist der Scatchardplot der Hühnereileiterzellen aufgetragen, der ohne Vorinkubation mit DES, sonst aber unter identischen Bedingungen ermittelt wurde.

2. Durchführung mit Auftrennung der Zellen in eine Cytoplasma- und Kernfraktion

Die Vorinkubation fand aus technischen Gründen mit nur einer DES-Konzentration statt (10 nmol DES/l). Die Vorinkubation und Hauptinkubation folgten dem unter Methoden V. 3. beschriebenen Ablauf.

Die anschließende Auswertung und graphische Darstellung der Bindungsdaten erfolgten wieder getrennt für beide Fraktionen nach der Scatchard-Methode (s. Abb. 8).

Wie dieses repräsentative Beispiel zeigt, nahm auch hier die maximale Bindungskapazität sowohl im Cytoplasma als auch in der Kernfraktion ab. Die Form der resultierenden Kurven zeigte einen ähnlichen Verlauf wie bei den Titrationen ohne Vorbeladung: in der Cytoplasmafraktion nach oben und in der Kernfraktion nach unten konvex (s. Abb. 8). Die Krümmung war jedoch stärker ausgeprägt als bei diesen Vergleichskurven.

Auch bei diesen Versuchen konnte die maximale Bindungskapazität, wie schon unter Ergebnisse II. 2. beschrieben wurde, nur angenähert errechnet werden.

Die MBC im Cytoplasma wurde um 28,2 $\pm$ 8,2 STDM % (n = 3), in der Kernfraktion um 42,9 $\pm$ 12,9 STDM % (n = 3) im Vergleich zu der der nicht-vorbeladenen Zellen vermindert. Diese Werte liegen im selben Bereich wie die nach der Vorbeladung der nicht-aufgetrennten Zellen ermittelten.

Auch die Werte der angenähert errechneten scheinbaren Dissoziationskonstanten lagen im selben Bereich wie die der nicht-vorbeladenen Zellen. Dies entspricht den Ergebnissen bei den nicht-aufgetrennten Zellen.

IV. Translokationsstudien an isolierten Hühnereileiterzellen

Wie schon unter Methoden VII. beschrieben worden ist, wurden alle 1 ml-Einzelansätze der 5 %igen Zellsuspension mit der gleichen Konzentration des tritiierten 17ß-Östradiols inkubiert, wobei die eine Hälfte der Ansätze DES als Kompetitor enthielt.

Die Einzelansätze wurden in Abständen von 20 Minuten aus dem Schüttelbad entnommen und im Kernseparator aufgearbeitet, bis nach 220 Minuten der letzte Ansatz entnommen worden war.

Danach wurde in der Cytoplasmafraktion der nicht-gebundene Hormonanteil mit der Dextrankohle-Methode und in der Kernfraktion durch Zentrifugation der Zellen in 2,5 %iger Rinderserumalbuminlösung in MEM, Typ Eagle (pH 7,4) abgetrennt.

Abbildung 11 zeigt den typischen Verlauf eines Translokationsexperiments mit kontinuierlicher Hormonbeladung (ausgewählt aus 11 reproduzierbaren Versuchen).

Diese Abbildung zeigt deutlich, daß nach 15-minütiger Inkubationszeit ein Maximum an rezeptorgebundener Radioaktivität im Cytoplasma zu finden ist. Danach fällt die spezifische Bindung trotz kontinuierlicher Inkubation auf ein Minimum bei 75 Minuten ab.

Die in der Kernfraktion gebundene Radioaktivität verhält sich in diesem Versuch zeitverzögert zu der in der Cytoplasmafraktion und erreicht ihren 1. flachen Radioaktivitätspeak nach 75 Minuten. Bei einigen der 11 durchgeführten Versuche war die Zunahme der Radioaktivität im Kern zeitlich parallel oder sogar früher als in der Cytoplasmafraktion zu sehen (s. Abb. 12).

Die Bindung im Bereich des 1. Peaks war bei allen Versuchen in der Kernfraktion deutlich niedriger als in der Cytoplasma-Peak 1-Fraktion.

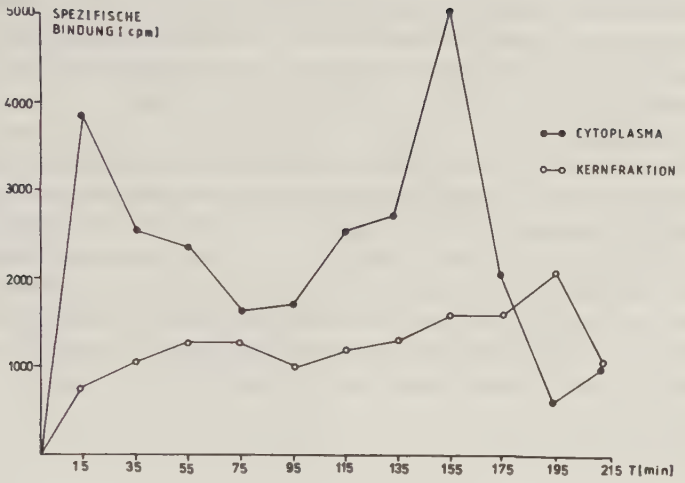


Abb. 11: Charakteristisches Profil eines Translokationsversuchs über 215 Minuten Inkubationszeit. Die Bindung in den Hühnereileiterzellen wurde in cpm getrennt für die Cytoplasma- und die Kernfraktion dargestellt.

Ein zweiter Peak an spezifisch gebundener Radioaktivität wurde im Cytoplasma nach 155 Minuten und in der Kernfraktion, in dem hier wiedergegebenen Experiment (s. Abb. 11), um 40 Minuten zeitversetzt gesehen. Wie Abbildung 12 zeigt, trat der 2. Peak in der Kernfraktion bei allen Hormonkonzentrationen zeitparallel oder zeitversetzt zum 2. Peak im Cytoplasma auf. Nur im Bereich der höchsten eingesetzten Hormonkonzentration kam es vor, daß der Peak in der Kernfraktion vor dem Peak im Cytoplasma zu sehen war (über 9 nmol Östradiol/l).

Diese 2. Peaks der spezifisch gebundenen Radioaktivität sind sowohl im Cytoplasma als auch in der Kernfraktion in ihrem Größenverhältnis zu den 1. Peaks der jeweiligen Versuche stark unterschiedlich. Auch hier überwiegt die spezifische Bindung im Cytoplasma die im Kernkompartiment.

Trotz dieser charakteristischen Kurvenform, die jeweils 2 Radioaktivitäts-Maxima aufweist (oft nur angedeutet), zeigten sich im zeitlichen Auftreten der Peaks und in ihrer Größe bzw. Form zum Teil erhebliche Unterschiede bei den einzelnen Versuchen.

Die oben schon einmal erwähnte Abhängigkeit im zeitlichen Auftreten der 2. Peaks von der hinzugegebenen Konzentration des tritiierten 17ß-Östradiols ist in Abbildung 12 wiedergegeben. Bis zu einer Konzentration von 5 nmol/l ist ihr zeitliches Auftreten konstant und unabhängig von der Hormonkonzentration. Bei höheren Konzentrationen kommt es dann zu einem späteren Auftreten. Bei sehr hohen Hormonkonzentrationen ist der 2. Peak im Kernkompartiment früher als im Cytoplasma zu sehen.

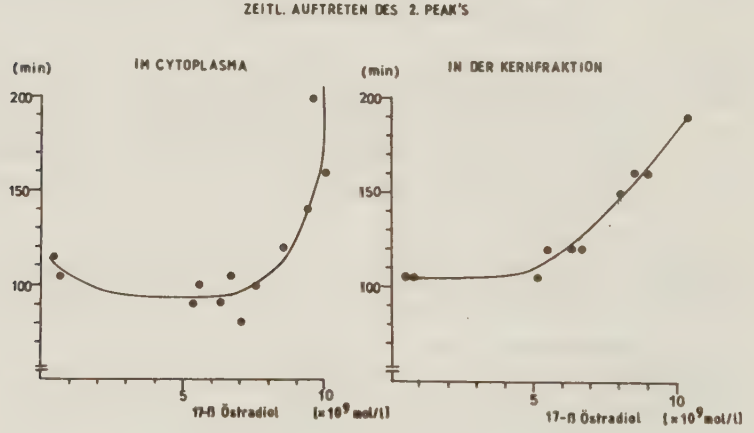


Abb. 12: Zeitliche Abhängigkeit im Auftreten des 2. Peaks im Cytoplasma und in der Kernfraktion von der eingesetzten Hormonkonzentration. Das Auftreten des 1. Peaks war sowohl im Cytoplasma als auch in der Kernfraktion unabhängig von der Hormonkonzentration.

Um ein Maß für die Größe des 2. Peaks zu gewinnen, wurde innerhalb der zeitlichen Grenzen, die mit 50 Minuten vor und mit 50 Minuten nach dem Auftreten des 2. Radioaktivitätsmaximum festgelegt wurden, graphisch integriert und die Größe des Peaks in cpm/mg Zellprotein/100 Minuten Inkubationszeit berechnet. Diese Größenangabe, in Beziehung zur eingesetzten Konzentration an 17ß-Östradiol gesetzt, ergibt die in Abbildung 13 wiedergegebene Abhängigkeit (s. Abb. 13 ●——●). Eine ausführliche Interpretation dieser Ergebnisse wird im Kapitel Diskussion gegeben.

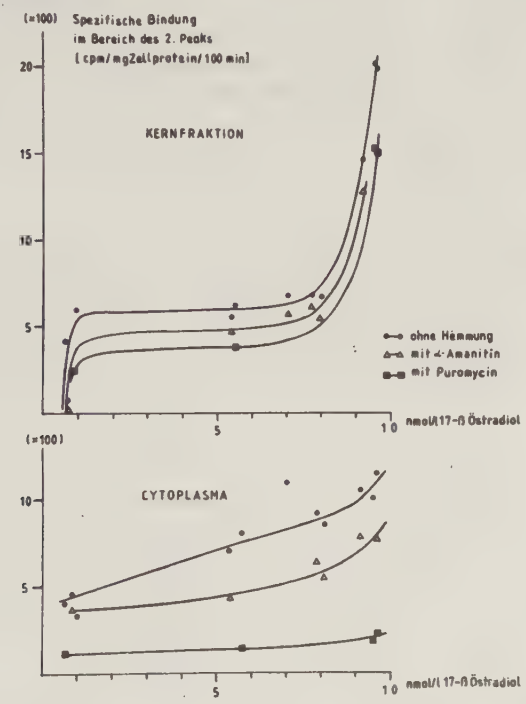


Abb. 13: Abhängigkeit der Bindung in Cytoplasma- und Kernfraktion im Bereich des 2. Peaks von der eingesetzten 17ß-Östradiolkonzentration. Zusätzlich wurde die spezifische Bindung nach α-Amanitin- und Puromycin-Hemmung eingezeichnet.

Für den 1. Radioaktivitätspeak der spezifischen Bindung ließ sich im Cytoplasma und in der Kernfraktion keine zeitliche Abhängigkeit seines Auftretens von der Hormonkonzentration feststellen. Die Größe des 1. Peaks stieg naturgemäß mit der Höhe des eingesetzten tritiierten 17ß-Östradiols an, ohne daß diese Schwankungen in der Bindung das Ausmaß der Schwankungen im Bereich des 2. Peaks erreicht hätten.

Es konnte dagegen eine Abhängigkeit der Größe des 1.Peaks von der Haltung der Versuchstiere gezeigt werden. Es fiel auf, daß die Hühner nach ihrer Verlegung aus der Freilandzucht in die beengten Käfige nach ungefähr einer Woche mit dem Eierlegen aufhörten und darüberhinaus ein aggressives Verhalten zeigten. Der Eileiter dieser Hühner war dann, wie sich bei der Entnahme zeigte, regelmäßig atrophisch und besaß nur noch ein Gewicht von 3 - 4 g (gegenüber 25 - 30 g Feuchtgewicht des Eileiters bei Legehühnern).

Die Translokationsstudien mit Zellen aus diesen atrophischen Eileitern, die unter gleichen Bedingungen wie die mit Zellen aus den Eileitern normaler Legehühner durchgeführt wurden, zeigten bezüglich des zeitlichen Auftretens und der Größe des 2. Peaks eine ähnliche Abhängigkeit wie die normalen Eileiterzellen.

Die Höhe des 1. Peaks war jedoch, im Vergleich zum 1. Peak bei den Legehühnern, wesentlich kleiner und zeigte, innerhalb der durch die Titration bedingten Größenzunahme gegebenen Grenzen, keine darüberhinausgehende Abhängigkeit von der hinzugegebenen 17ß-Östradiolkonzentration (s. Abb. 14). Diese Unterschiede zum 1. Peak bei den Legehühnern zeigten sich sowohl im Cytoplasma als auch in der Kernfraktion.

Die Höhe des 1. Peaks in der Kernfraktion beträgt beim atrophischen Eileiter 72 $\pm$ 40 STDM fmol/mg Zellprotein (n = 3) gegenüber 319 $\pm$ 59 STDM fmol/mg Zellprotein (n = 8) beim Eileiter des Legehuhns.

Die Höhe des 1. Peaks im Cytoplasma beträgt analog dazu 68 ± 21 STDM fmol/mg Zellprotein (n = 3) gegenüber 291 ± 98 STDM fmol/mg Zellprotein (n = 8).

Wie die relativ hohen Standardabweichungen der Mittelwerte schon zeigen, unterschieden sich die Einzelwerte in den verschiedenen Versuchen in Abhängigkeit von den eingesetzten Hormonkonzentrationen deutlich voneinander, ohne daß jedoch die deutlichen Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Bindung in Zellen aus dem atrophischen und dem normalen Eileiter verdeckt werden würden.

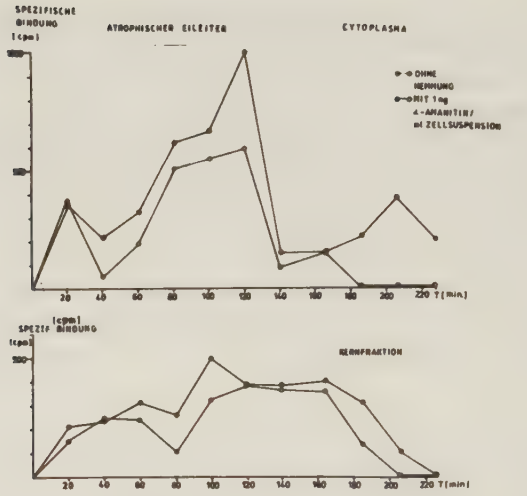


Abb. 14: Charakteristisches Profil eines Translokationsexperiments aus einem atrophischen Eileiter. Die Bindung in den Zellen ist getrennt für das Cytoplasma und die Kernfraktion, sowie die Bindung in beiden Komponenten nach α-Amanitin-Hemmung, wiedergegeben.

V. Translokationsstudien an isolierten Hühnereileiterzellen mit Bestimmung des durch α-Amanitin und Puromycin hemmbaren Anteils der Rezeptorneusynthese

Der Versuchsablauf ist, wie schon unter Methoden VIII. beschrieben wurde, dadurch gekennzeichnet, daß parallel zu den nur mit Hormon inkubierten Zellansätzen, die zur einen Hälfte den 100-fachen Überschuß DES als Kompetitor enthielten, analoge Zellansätze mitliefen, die α-Amanitin oder Puromycin in hemmwirksamen Konzentrationen enthielten (1 ng α-Amanitin/ml Zellsuspension; 300 µg Puromycin/ml Zellsuspension).

Einen für die α-Amanitin-Hemmung typischen Versuch zeigt Abbildung 14, in der die spezifische Bindung in Kern- und Cytoplasmakompartiment ohne bzw. mit α-Amanitin-Hemmung in cpm wiedergegeben wurde. Die Differenz zwischen den 2 Werten eines Zeitpunkts entspricht dem durch α-Amanitin hemmbaren Anteil der Rezeptorneusynthese zu diesem Zeitpunkt, der mit der Titration erfaßt wurde. Entsprechendes gilt für die Hemmung der Rezeptorsynthese mit Puromycin.

Es zeigte sich, daß eine Hemmbarkeit des 1. Radioaktivitäts-Peaks (s. Abb. 14) sowohl im Cytoplasma als auch in der Kernfraktion innerhalb der methodenbedingten Schwankungen kaum vorhanden war. Gleiche Beobachtungen konnten bei der Anwendung von Puromycin gemacht werden (ohne Abbildung).

Dies kann nicht darauf zurückgeführt werden, daß durch eine eventuell verzögerte Aufnahme der Hemmstoffe in die Zelle oder einen verzögerten Beginn der Hemmwirkung zu diesem Zeitpunkt noch keine Wirkung der eingesetzten Hemmsubstanzen zu sehen sein konnte, da die im Kapitel Methoden unter I. 1. beschriebenen Versuche über die Intaktheit der isolierten Zellen gezeigt haben, daß sofort nach der Isolierung die mit α-Amanitin bzw. Puromycin inkubierten Zellsuspensionen die gleiche Verminderung des (U-^{14}C) L-Leucineinbaus zeigten, die die Zellsuspensionen nach der 6-stündigen Inkubationszeit mit diesen Hemmstoffen aufwiesen. Dieses Ergebnis wird auch durch Parallelansätze bestätigt, bei denen die Zellsuspensionen zwischen

10 Minuten und 2 Stunden vor der eigentlichen Inkubation mit tritiiertem 17ß-Östradiol in Kontakt gebracht wurden und die zu keiner stärkeren Hemmung des 1. Peaks führten.

Der weitere Kurvenverlauf zeigte mit zunehmender Inkubationsdauer eine, je nach Einsatz des α-Amanitins oder des Puromycins, unterschiedliche Verringerung der spezifischen Bindung des tritiierten 17ß-Östradiols. Diese Abnahme der spezifischen Bindung, die auf einer Blockierung der Rezeptorneusynthese zu beruhen scheint, war besonders im Bereich des 2. Peaks ausgeprägt (s. Abb. 13 und 14).

Wie schon unter Ergebnisse IV. beschrieben, wurde als Maß für die Größe der spezifischen Bindung unter dem 2. Peak über 100 Minuten graphisch integriert und dieser Wert dann auf 1 mg Zellprotein der Zellsuspension bezogen. Dieser nach Hemmung der Rezeptorneusynthese mit α-Amanitin oder Puromycin ermittelte Wert wurde dann in Beziehung gesetzt zur eingesetzten tritiierten 17ß-Östradiolkonzentration und als Vergleich die Bindung ohne Hemmung der Proteinsynthese in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration eingezeichnet (s. Abb. 13).

Es zeigt sich, daß bei steigenden tritiierten 17ß-Östradiolkonzentrationen und damit zunehmender spezifischer Bindung im Cytoplasma im Bereich des 2. Peaks der nicht-puromycin-hemmbare Anteil der Bindung nahezu konstant bleibt (ca. 100 - 200 cpm/mg Zellprotein/100 min). Den größten Anteil an der Gesamtbindung hat der Puromycin- und nicht-α-Amanitin-hemmbare Teil der Bindung, der auch bei höheren Hormonkonzentrationen am stärksten zunimmt. Der α-Amanitin-hemmbare Anteil erreicht bei 5 - 6 nmol 17ß-Östradiol/l einen Maximalwert, der dann auch bei höheren Hormonkonzentrationen konstant bleibt.

In der Kernfraktion ist der weder mit Puromycin- noch mit α-Amanitin-hemmbare Anteil der Gesamtbindung bei allen Hormonkonzentrationen über 1 nmol 17ß-Östradiol/l der prozentual größte Anteil. Er ist auch größer als der entsprechende Bin-

dungsanteil im Cytoplasma. Sein Verlauf steigt von ca. 0,5 bis 1,5 nmol 17ß-Östradiol/l an, um dann einen Plateauwert zu erreichen. Über 7,5 nmol 17ß-Östradiol/l steigt dann dieser Anteil der Gesamtbindung sehr stark an.

Die α-Amanitin- und Puromycin-hemmbaren Bindungsanteile haben über nahezu den gesamten Konzentrationsbereich einen konstanten Wert, der nur oberhalb von 8 nmol 17ß-Östradiol/l leicht zunimmt.

Aus der Differenz zwischen der α-Amanitin- und der Puromycin-Hemmung läßt sich der durch Translation von schon vor Versuchsbeginn in der Zelle vorhandener m-RNA neusynthetisierte Rezeptoranteil erkennen.

Der Verlauf der spezifischen Bindung in beiden Kompartimenten (ohne Zusatz von Hemmsubstanzen) läßt sich wie folgt charakterisieren. Die Bindung hat in der Kernfraktion bis zu einer Hormonkonzentration von 7,5 nmol/l einen Plateauwert von ca. 600 - 700 cpm/mg Zellprotein/100 min. Die Bindung im Cytoplasma nimmt dagegen über den gesamten Konzentrationsbereich hin konstant zu. Bei Hormonkonzentrationen über 7,5 nmol/l nimmt die Bindung in der Kernfraktion rasch bis auf einen fast doppelt so hohen Wert wie die Bindung im Cytoplasma zu.

VI. Anwendung des Ganzzellassays auf Mammakarzinomzellen mit anschließender getrennter Auswertung der Bindung in der Cytoplasma- und in der Kernfraktion

Die Herstellung der 2 - 3 %igen Zellsuspension in MEM, Typ Eagle, mit dem Zusatz von 25 %igem (v/v) foetalem Kälberserum erfolgte, wie bei Methoden III. beschrieben wurde.

Die eventuell im foetalen Kälberserum vorhandenen natürlichen Steroidhormone wurden durch die Inkubation mit 10 %iger (v/v) Dextran-beschichteter Kohle bei Zimmertemperatur und anschließender dreimaliger Zentrifugation des Überstands bei 3000 Upm über 3 Minuten entfernt.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Ansätze mit tritiiertem 17ß-Östradiol in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10 nmol/l und, bei der Hälfte der Ansätze, mit dem 100-fachen Überschuß DES als Kompetitor.

Nach Abschluß dieser 30-minütigen Inkubation erfolgte analog zum weiteren Vorgehen bei den Eileiterzellen die Auftrennung der Zellen im Kernseparator.

Das Entfernen des freien und des größten Teils des unspezifisch gebundenen Hormons wurde im Cytoplasma mit der Dextrankohle-Methode und in der Kernfraktion mit 2,5 %igem Rinderserumalbumin in MEM vorgenommen.

1. Lichtmikroskopische Kontrolle der Kernseparierung

Lichtmikroskopisch war die Cytoplasmafraktion frei von Tumorzellen und von Zellbruchstücken.

Die Kernfraktion bestand aus mit Trypanblau anfärbbaren Kernen, die nur noch in etwa 10 % der Fälle Zellmembranreste und Teile des endoplasmatischen Retikulums trugen. Es waren keine (nach der Trypanblau-Methode) als intakt zu bezeichnenden Zellen in dieser Kernfraktion zu sehen.

2. Scatchardanalysen

Die Auftragung der aus diesen Versuchen gewonnenen Bindungsdaten erfolgte nach Scatchard (1949).

Im Gegensatz zu den Kernseparierungsversuchen bei den Eileiterzellen hatten die Scatchardplots der Mammakarzinomzellen die Form einer Geraden, wenn es sich auch nicht ausschließen läßt, daß eine eventuell vorhandene geringe Krümmung wegen der begrenzten Zahl der Titrationspunkte übersehen wird.

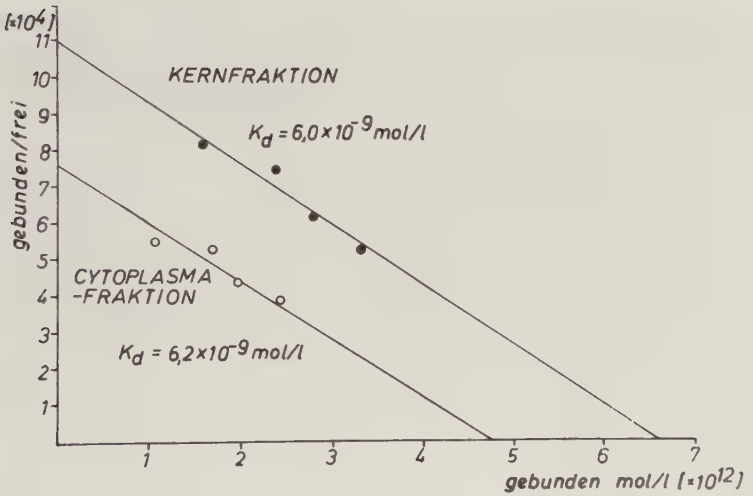


Abb. 15: Repräsentativer Scatchardplot von Bindungsdaten eines Mammakarzinoms. Die Auswertung erfolgte getrennt für die Cytoplasma- und die Kernfraktion. Auf der Abszisse ist die Konzentration des gebundenen tritiierten 17ß-Östradiols aufgetragen.

Aus diesen Geraden wurden für das Cytoplasma und die Kernfraktionen die scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d's) und die maximalen Bindungskapazitäten (MBC's) der Rezeptoren errechnet. Die aus 4 untersuchten Mammakarzinomen erhaltenen Daten wurden den Ergebnissen gegenübergestellt, die mit schon bewährten Methoden, wie der Dextrankohle-Methode und der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, gewonnen worden waren.

MAMMAKARZINOME		CYTOSOL				ISOLIERTE ZELLEN				
						CYTOPLASMA	KERNE			ZUSAMMEN
NAME DER PATIENTIN	MENOPAUSEN-STATUS	SCATCHARD-ANALYSEN		SACCHAROSE DICHTE-GRADIENTEN PEAKS		GANZZELLSCATCHARDANALYSEN				
		MBC [fmol/mg Cyt.prot]	K_d [$\times 10^{-9}$ mol/l]	4 s	8 s	MBC [fmol/mg Zellprot.]	K_d [$\times 10^{-9}$ mol/l]	MBC [fmol/mg Zellprot.]	K_d [$\times 10^{-9}$ mol/l]	MBC [fmol/mg Zellprotein]
G.S. geb.21.12.37	HYSTEREKTOMIE 1977, klinisch PRÄMENOPAUSE	<10	nicht bestim. bar	-	-	5,9	6,2	8,3	6,0	14,2
T.K. geb.13.10.49	PRÄMENOPAUSE	<10	nicht bestim bar	(+)	-	8,3	4,6	9,9	4,6	18,2
E.W. geb.14.12.29	POSTMENOPAUSE	<10	nicht bestim. bar	+	(+)	3,9	5,1	2,4	4,9	6,3
R.SCH. geb.27.12.31	HYSTEREKTOMIE 1971, klinisch POSTMENOPAUSE	22,3	2,0	+	+	-	-	24,8	2,4	24,8

Tab. 2: Diese Tabelle zeigt die Ergebnisse, die an vier verschiedenen Mammakarzinomen durch die parallele Anwendung der Dextrankohle-Methode und der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation am Tumorcytosol (bei 4° C) und durch die Ganzzellassay-Methode (bei 37° C) mit getrennter Auswertung der Bindung in der Cytoplasma- und in der Kernfraktion gewonnen wurden.

In den ersten drei Tumoren zeigten die Scatchardplots, die mit der Dextrankohle-Methode im Cytosol bestimmt worden waren, einen nach oben rechts ansteigenden Verlauf (ohne Abbildung). Dieser Verlauf ist typisch für eine nicht-sättigbare, also den Kriterien eines Rezeptors nicht entsprechende Bindung. Aus diesen mit der Routinemethode ermittelten Kurven ließen sich daher auch keine scheinbaren Dissoziationskonsten und maximalen Bindungskapazitäten errechnen. Im Untersuchungsbefund werden diese Tumoren daher in die Kategorie MBC $<$ 10 fmol/mg Cytosolprotein, entsprechend einer als gering zu erwartenden Remissionsrate bei Einsatz der endokrinen Therapie, eingeordnet.

In den ersten beiden Tumoren (Patientinnen G.S. und T.K.) zeigten sich keine oder nur gering angedeutete 4 S- und 8 S-Peaks in der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Der dritte Tumor (Patientin E.W.) besaß einen deutlichen 4 S-Peak, ohne ein für Zielorgane charakteristisches, deutlich ausgeprägtes 8 S-Aggregat aufzuweisen. Hier sei noch einmal darauf hingewiesen, daß die Beladung der Rezeptoren mit tritiiertem 17ß-Östradiol bei den beiden oben genannten Methoden bei 4° C, also nicht bei Exchange-Bedingungen, geschah. Eventuell mit endogenem Hormon besetzte Rezeptoren können mit diesen Methoden daher nicht erfaßt werden.

Bei Anwendung der Ganzzellassay-Technik konnten bei den beiden sich in der Prämenopause befindenden Patientinnen G.S. und K.T. Hormon-Rezeptorkonzentrationen in Höhe von 14,2 bzw. 18,3 fmol/mg ZELLPROTEIN erfaßt werden. Diese Bindungskapazitäten lassen sich nicht ohne weiteres mit den durch die bisherigen Methoden gewonnenen Bindungskapazitäten vergleichen, da diese als fmol/mg CYTOSOLPROTEIN berechnet wurden. Man kann jedoch annehmen, daß die auf Cytosolprotein bezogenen Werte größer als die auf Zellprotein bezogenen Rezeptorkonzentrationen ausfallen, da im letzteren Fall mehr Nicht-Rezeptorproteine in den Wert miteingehen.

Bei dem Tumor der Patientin E.W., die sich in der Postmeno-

pause befand, konnte mit meiner Methode eine Gesamt-MBC von 6,3 fmol/mg Zellprotein ermittelt werden, obwohl bei Anwendung der Dextrankohle-Methode auch dieser Tumor keinen auswertbaren Scatchardplot aufwies. Es konnte so die genaue MBC und die scheinbare Dissoziationskonstante bestimmt werden. Dieser Tumor war nach den Ergebnissen der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation als rezeptorpositiv einzustufen.

Bei den ersten drei Tumoren kann man die Translokation der Rezeptoren in den Kern sehen, die bei den hier untersuchten Tumoren jedoch nicht quantitativ gleich zu sein scheint.

Beim vierten Tumor (Patientin R.Sch.) handelte es sich um einen nach der Dextrankohle-Methode positiven Tumor, der auch in der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation einen deutlichen 4 S- und 8 S-Peak besaß.

Bei der Scatchardanalyse der isolierten Zellen mit anschließender Auftrennung in Cytoplasma- und Kernfraktion konnte bei diesem Tumor im Cytoplasma keine Bindung festgestellt werden. Die Translokation scheint in diesem Fall vollständig zu sein. Die MBC in der Kernfraktion betrug 24,8 fmol/mg Zellprotein im Vergleich zu der im Cytosol ermittelten MBC von 22,3 fmol/mg Cytosolprotein. In Anbetracht des Bezuges auf mg Zellprotein scheint mit der Ganzzellassay-Technik eine höhere Rezeptorkonzentration ermittelt worden zu sein.

Trotz der unterschiedlichen Inkubationstemperaturen von 4° C bei der Dextrankohle-Methode und 37° C bei der Ganzzellassay-Technik waren die beim vierten Tumor ermittelten scheinbaren Dissoziationskonstanten von 2,0 bzw. 2,4 mol/l nahezu identisch.

Die in den ersten drei Tumoren ermittelten scheinbaren Dissoziationskonstanten lagen alle im Bereich der auch bei den Hühnereileiterzellen ermittelten K_d's (von 1 - 10 x 10^{-9} mol/l). Sie lassen sich aus Tabelle 2 entnehmen.

DISKUSSION

I. Zellsuspensionen

Die von mir entwickelten Methoden zur Gewinnung isolierter, intakter Zellen aus Mammakarzinomen und aus dem Hühnereileiter basieren auf Erkenntnissen von Howard und Pesch (1968) und auf Modifikationen von Williams und Gorski (1973, 1974). Die Arbeitsgruppe von Howard und Pesch arbeitete mit Lebergewebe, die von Williams und Gorski mit Uterusgewebe. Williams und Gorski benutzten dabei zusätzlich zum Enzym Kollagenase Trypsin (0,35 %ig) und inkubierten die Uterusschnitte mit beiden Enzymen über 30 Minuten bei 37° C. Zur Aktivierung der Kollagenase gaben sie 0,0115 mol $CaCl_2$/l hinzu. Die damit erzielte Zellausbeute betrug 42 % des Gewebefeuchtgewichts.

Die Anwendung von Trypsin (0,35 %ig) und von Pronase (0,5 %ig) führte im Vergleich zur alleinigen Anwendung von Kollagenase beim Hühnereileiter, bzw. im Vergleich zur Anwendung von Kollagenase und Hyaluronidase in Kombination bei den Mammakarzinomen, zu keiner Erhöhung der Zellausbeute.

Auf Trypsin wurde in der hier vorgestellten Methode auch deshalb verzichtet, da nach Younger (1954) die Ausbeute nach einer auf der Anwendung von Trypsin basierenden Methode bei verschiedenen tierischen Geweben nur 30 % des Gewebefeuchtgewichts betrug, und da außerdem nach Johnson et al. (1972) durch Trypsin die Oberfläche der Zellen angegriffen wurde, so daß Hormonrezeptoren an der Oberfläche zerstört wurden.

Die zusätzliche Inkubation der Gewebe mit DNAase, um die Bildung von schleimigen Aggregaten aus aufgebrochenen Zellen zu vermeiden, führte (wie auch die Anwendung von Elastase) nur zu einer Abnahme der Zellviabilität bei gleichbleibender Ausbeute.

Nach der Methode von Seglen (1972a, 1972b, 1973) wurden die Gewebsschnitte in calciumfreiem Puffer inkubiert, um durch

das Auswaschen der Calcium-Ionen den Zusammenhalt der Zellverbände zu lockern. Diese Beobachtung geht auf Berry und Friend (1969) zurück, die in elektronenmikroskopischen Studien zeigten, daß die Wirkung des Calcium-Entzugs bei der Aufschließung von Leberzellverbänden darin besteht, daß die Desmosomen der Parenchymzellen durch den Calcium-Entzug in je zwei Hemidesmosomen gespalten werden, die dann in die Zelle invaginiert und abgebaut werden.

Nach diesem Vorgang können die Zellen in ein calciumhaltiges Medium gebracht werden, ohne daß sich unter den Versuchsbedingungen wieder feste Zellzusammenschlüsse bilden.

Zur Aktivierung der Kollagenase sind nach Seifter und Harper (1970) Calcium-Ionen notwendig. Da trotz der Verwendung des calciumfreien Krebs-Ringer Puffers in meinen Versuchen eine ausreichend hohe Zellausbeute bei der Gewebsaufschließung erreicht wurde, scheinen die zur Aktivierung der Kollagenase notwendigen Calcium-Ionen in den kommerziellen Enzympräparationen in genügend hoher Konzentration vorhanden zu sein.

Auf die Anwendung von Calcium-Bindern, wie EDTA (Berry, 1969; Hommes et al., 1970) und Citrat (Capuzzi et al., 1971), wurde verzichtet, da diese die Kollagenase weitgehend inaktivieren und darüberhinaus zu Veränderungen der Zellmembranpermeabilität und zur Zerstörung von Rezeptoren der Zelle führen können (Capuzzi et al., 1971).

Kollagenase erwies sich (in Kombination mit Hyaluronidase bei den Mammakarzinomen) als das Enzym der Wahl, um morphologisch und biochemisch intakte Eileiter- und Mammakarzinomzellen zu isolieren. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Untersucher, wobei allerdings die Anwendung von Kollagenase (und Hyaluronidase) je nach Zielgewebe modifiziert werden mußte (Ingebretsen und Wagle bei der Leber, 1972; Bojar et al. bei Leber, Niere und Hypernephrom, 1975a, 1975b, 1976a, 1976b, 1976c, 1976d; Dittmann bei der Isolierung von Nierentubuli, 1977).

Die anschließende mechanische Aufschließung nicht vollständig aufgeschlossenen Gewebes scheint nach Berry und Friend (1969) unerläßlich zu sein, da erst durch die mechanische Einwirkung die Lösung der Tight- und Gap-Junctions möglich ist. Nach den elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe reißt dabei die Junction in einer der beiden benachbarten Zellen aus und hinterläßt einen Membrandefekt, der bei kleinerem Ausmaß von der Zellmembran verschlossen werden kann und bei größerem Ausmaß zum Untergang der Zelle führt. Die andere Zelle trägt die ausgerissene komplette Junction und bleibt intakt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Hühnereileiterzellen zeigten keine Membrandefekte (s. Abb. 5 A - D). Die Zellausbeute von 35 - 40 % des Gewebefeuchtgewichts läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß dieser Mechanismus, der zu einer teilweisen Zerstörung der Zellen führt, auch bei der Isolierung der Eileiterzellen eine Rolle spielt.

Ein weiterer Grund für die nicht mehr als 40 %ige Ausbeute liegt darin, daß bei der Zellisolierung nahezu selektiv die Muskelzellen zerstört werden, die einen großen Prozentsatz des Gewebefeuchtgewichts des Eileiters ausmachen. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Zellsuspension ließen sich keine, bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung nur sehr vereinzelt Muskelzellen identifizieren (s. Abb. 5 D).

Die morphologische und funktionelle Intaktheit der Zellen wurde darüberhinaus lichtmikroskopisch mit der Trypanblau-Methode, durch den in vitro-Nachweis der Zilienbewegungen und durch die Fähigkeit der Zellen zur Proteinsynthese direkt nach der Isolierung und nach der 6-stündigen Inkubationszeit bei 37° C nachgewiesen.

Auch die molekulare Integrität des Östrogenrezeptors, die sich in seiner Affinität zum Hormon und damit in seiner scheinbaren Dissoziationskonstanten ausdrückt, ist als weiteres Zeichen für die Intaktheit der subzellulären Zellkompartimente zu wer-

ten. Die scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d's) der Östrogenrezeptoren in den Eileiter- und in den Mammakarzinomzellen lagen bei den Ganzzellassays im Bereich von 10^{-9} mol/l und ähnelten damit den von anderen Untersuchern im Cytosol von Mammakarzinomen, laktierendem Brustgewebe von Ratten, Rattennieren, menschlichen Nieren, menschlichen Hypernephromen, Rattenuteri, Prostatakarzinomen und Hühnerovidukten gefundenen Werten, die für den Östrogenrezeptor (je nach Versuchsbedingungen) im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-10} mol/l lagen (Träger, 1977; King, 1974; Wittliff, 1971, 1972, 1977; McGuire, 1973; Hähnel und Twaddle, 1970; Feherty, 1971; Bojar, 1976a, 1976b, 1976c; Liskowski, 1976a, 1976b; Erikson, 1980).

Bei den bei 37° C durchgeführten Bestimmungen der K_d ging die Tendenz eher zu Ergebnissen, die im 10^{-9} mol/l-Bereich lagen (Williams und Gorski bei Rattenuteruszellen, 1974; Kalimi et al. in Hühneroviduktkernen mit einer K_d von 2×10^{-9} mol/l, 1976). Dies stimmt gut mit den von mir bei 37° C ermittelten Werten von $2,8 \pm 1,6 \times 10^{-9}$ mol/l für die ganzen Zellen und von $3,6 \pm 2,5 \times 10^{-9}$ mol/l für die Cytoplasmafraktion und $4,0 \pm 1,4 \times 10^{-9}$ mol/l für die Kernfraktion überein.

Die relativ geringe Ausbeute von 10 % des Tumorfeuchtgewichts, die mit den Methoden B und C aus Mammakarzinomen zu erzielen war, läßt sich durch folgende Überlegungen erklären:

Die zum großen Teil szirrhösen Mammakarzinome und Karzinome vom simplex-(solidum)-Typ besitzen einen großen Faser- und Grundsubstanzanteil am Tumorfeuchtgewicht. Die Ausgangszahl der zu isolierenden Zellen pro Gewebseinheit ist daher kleiner als bei anderen Zielgeweben.

Zusätzlich bereitet die Lokalisation der Zellen, die in Form von Zellnestern fest eingebettet in Fasermaterial liegen und bei der Inkubation mit Kollagenase und Hyaluronidase z.T. nur schlecht erreicht werden, Schwierigkeiten.

Vorversuche zeigten, daß die Tumorzellen gegen mechanische und/oder sonstige Beeinflussungen (wie Temperatur, Substratversorgung und pH) empfindlicher als Hühnereileiterzellen reagierten und deshalb bei der Aufschließung des Tumorgewebes zu einem höheren Prozentsatz als z.B. Hühnereileiterzellen zerstört wurden.

Ein weiterer Grund ist sicher der im Tumorfeuchtgewicht enthaltene Anteil an nekrotischen Partien des Tumors und der Anteil durch Sauerstoff- und Substratmangel partiell geschädigter Tumorzellen, der dann beim enzymatischen Aufschließungsschritt endgültig zugrunde geht.

Die erzielte Zellausbeute von 10 % des Tumorfeuchtgewichts reichte aber aus, um aus einem mindestens 3 g wiegenden Tumor einen Scatchardplot mit vier verschiedenen Hormonkonzentrationen (in Doppelansätzen) durchführen zu können.

Die Zellausbeute beim Hühnereileiter (35 - 40 % des Gewebefeuchtgewichts bei Legehühnern) reichte außer bei den atrophischen Eileitern aus, um Versuche mit nahezu beliebig vielen Einzelansätzen durchführen zu können. Bei den Versuchen mit Zellen aus den atrophischen Eileitern mußten dagegen des öfteren die Eileiter von mehreren Hühnern für ein Translokationsexperiment zusammengelegt werden, um eine ausreichende Zahl von isolierten Zellen zu gewinnen.

Bei der Isolierung von Tumorzellen aus Mammakarzinomen stellt sich die prinzipielle Frage, ob durch die mechanischen und enzymatischen Aufschließungsschritte, bei denen aus der heterogenen Tumorzellpopulation die empfindlichsten Zellen bevorzugt zerstört werden, zugleich eine Selektion der Zellen hinsichtlich des Rezeptorgehalts stattfindet.

So kann man sich vorstellen, daß bei der neoplastischen Transformation der Zellen parallel zu einem Verlust der Fähigkeit zur Rezeptorsynthese auch die Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen geändert wird. Dadurch könnten bei einer

Scatchardanalyse Bindungskapazitäten ermittelt werden, die nicht für den gesamten Tumor repräsentativ sind (s. Bruchovsky und Van Dorn, 1976).

Bei den mit der Dextrankohle-Methode am Tumorcytosol durchgeführten Scatchardanalysen ist eine ähnliche Fehlerquelle denkbar. Dort findet mit den bei der Ultrazentrifugation nicht entfernten Nicht-Rezeptorproteinen der interzellulären Grundsubstanz eine "Verdünnung" der aus den Zellen stammenden Rezeptorproteine statt. Da das Verhältnis des Grundsubstanzvolumens zum Zellvolumen bei den verschiedenen histologischen Tumortypen stark unterschiedlich ist, kann man sich vorstellen, daß hier fälschlich zu niedrige Rezeptorkonzentrationen ermittelt werden, die in Grenzfällen zu einem Ausschluß eines hormonsensiblen Tumors von der endokrinen Therapie führen könnten. Die Mehrzahl der zellfremden Proteine kann jedoch mit der heute verwendeten Präparationstechnik entfernt werden.

Nach Hähnel und Twaddle (1978) besteht jedoch eine hohe Übereinstimmung, unabhängig davon, ob der Rezeptorgehalt auf das Tumorfeuchtgewicht, auf den DNA-Gehalt oder auf mg Cytosolprotein bezogen wird. In dieser Untersuchung gab es jedoch einige wenige Tumoren, bei denen der Bezugswert für die Beurteilung hinsichtlich einer endokrinen Therapie eine Rolle spielte.

Ob diesen möglichen Fehlerquellen in der Praxis eine Bedeutung zukommt, kann erst sicher nach weiteren eingehenden Untersuchungen festgestellt werden.

Abschließend läßt sich sagen, daß mit den hier vorgestellten Zellisolierungsverfahren ausreichende Mengen vitaler, isolierter Zellen für Rezeptorbindungsstudien an Mammakarzinomen und Hühnereileitern zu gewinnen sind.

II. Scatchardanalysen von Hühnereileiterzellen

Die Bedeutung des Hühnereileiters als Studienobjekt für die Durchführung von Untersuchungen über das grundsätzliche Verhalten des Östrogenrezeptors wurde von Palmiter (1972, 1975) und von O'Malley et al. (1969) erkannt. Da durch die Exstirpation eines Eileiters genügende Mengen an Gewebe auch für die Durchführung umfangreicher Translokationsversuche zur Verfügung standen, wählte ich in meiner Arbeit den Hühnereileiter als Modellgewebe für die Vorarbeiten und grundsätzlichen Untersuchungen über das Rezeptorverhalten. Das eigentliche Ziel dieser Arbeit war es, eine Ganzzellscatchard-Technik für Mammakarzinome zu entwickeln.

Die an intakten, isolierten Hühnereileiterzellen durchgeführten Scatchardanalysen (s. Abb. 7) zeigten einen monophasischen Verlauf, wie er auch in mehreren anderen Östrogenzielgeweben, wie z.B. in Rattenleberzellen, in Rattenuteri, laktierendem Brustgewebe von Ratten und in Mammakarzinomen, gefunden wurde (Wittliff et al., 1971, 1977; Gorski et al., 1968; Jensen et al., 1977). Dies weist auf eine singuläre Klasse von Bindungsstellen in dem hier benutzten Konzentrationsbereich des tritiierten 17ß-Östradiols hin.

Die von mir ermittelten maximalen Bindungskapazitäten sind, wie oben schon erwähnt, nicht auf mg Cytosolprotein, sondern auf mg Zellprotein bezogen. Die MBC der Rezeptoren im Cytosol des Hühnereileiters, die von King und Mainwaring (1974) ermittelt wurde, ist im Vergleich zu der von mir in den Zellen (nach Auftrennung der Zellen in eine Cytoplasma- und Kernfraktion) ermittelten MBC von 41,7 $\pm$ 13,0 STDM fmol/mg Zellprotein nur scheinbar größer, da bei den Ganzzellscatchardanalysen viele Nicht-Rezeptorproteine in die Bezugsgröße miteingehen.

Um die weiteren Ergebnisse der Hühnereileiterversuche im Kontext der bisher entwickelten Vorstellungen zu sehen, seien hier noch einmal die wesentlichen Punkte des Östrogenrezeptor-

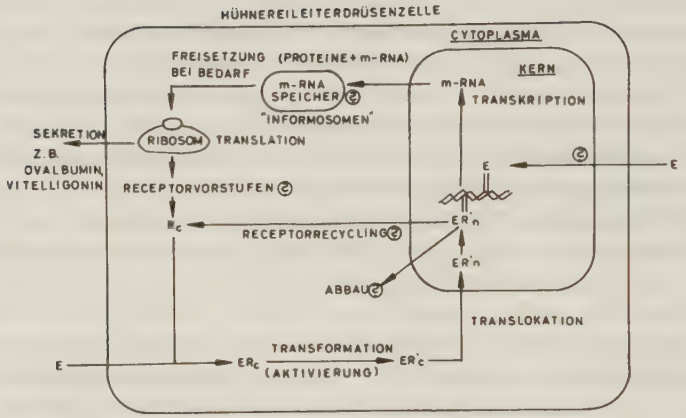


Abb. 16: Dieses Modell faßt die heute allgemein anerkannten Schritte im Verhalten des Östrogenrezeptors in der Zelle zusammen (hier am Beispiel der Hühnereileiterdrüsenzelle). Es ist nach einer Abbildung von Wittliff et al. von mir erweitert worden (Wittliff et al., 1974, 1977, 1978). Diese bisher spekulativen Teile des Modells sind mit Fragezeichen kenntlich gemacht.

modells dargestellt, wie sie von Jensen (1960, 1962, 1974) und Gorski et al. (1968) unabhängig voneinander entwickelt wurden.

Nach passiver Diffusion des lipophilen Östradiols durch die Zellmembran (eventuell durch erleichterte, nicht energieverbrauchende Diffusion über ein Transportmolekül, s. Jensen und Jacobson, 1960; Träger, 1977) erfolgt die Bindung des

Hormons an die cytoplasmatische Form des Rezeptors (Rc). Diese Bindung ist ein Prozeß, der auch bei 0° C abläuft.

Der sich daran anschließende Aktivierungsprozeß der Hormon-Rezeptorkomplexe (ERc) ist temperaturabhängig und führt in der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation zu einer 5 S-Form (Kalimi et al., 1973; Jensen und DeSombre, 1972). Dieser Prozeß hat sein Geschwindigkeitsmaximum bei einer Temperatur von 20 - 37° C, also bei physiologischen Temperaturen. Er kann aber auch bei niedrigeren Temperaturen ablaufen, wenn geeignete Salzkonzentrationen im Medium vorhanden sind (Kalimi et al., 1973).

Nach dieser Aktivierung (ERc') wird der Hormon-Rezeptorkomplex in den Kern translociert. Dieser Prozeß dauert bei einer Temperatur von 37° C in Rattenuteruszellen etwa 30 Sekunden (Munck und Wira, 1975). Nach Bloom et al. (1980) dauert er in isolierten Leberzellen (HTC-Zellen) für den Glucocorticoidrezeptor 45 - 60 Sekunden.

Im Kern erfolgt die Bindung diese Komplexes wahrscheinlich an die Nicht-Histonproteine des Chromatins (King und Mainwarin, 1974) und führt dort über eine Labilisierung des DNA-Chromatin-Komplexes (Tsai et al., 1976) zu einer Steigerung der m-RNA Transkription.

O'Malley et al. (1969, 1974) und Pennequin et al. (1978) zeigten, daß z.B. die Synthese der Ovalbumin-m-RNA im Hühnereileiter unter dem Einfluß von Östradiol um das 40-fache zunimmt. Außerdem wurde von Palmiter (1972) gezeigt, daß unter dem Östradioleinfluß im Hühnereileiter die Initiation der Polypeptide, die Größe der Polysomen im Cytoplasma und die Elongationsrate der Polypeptide bei der m-RNA Translation zunehmen. Auch die Induktion der Vitelligoninsynthese im Hühnereileiter wird durch Östradiol bewirkt (Tata, 1976). Dabei ist sehr schnell nach der Östrogenapplikation eine Stimulation der m-RNA Synthese festzustellen (Beginn 30 Minuten nach der

Gabe des Hormons und 10 Minuten nach dem Erreichen der maximalen Hormon-Rezeptorkomplexkonzentration im Kern, nach Kalimi et al., 1976).

Über das weitere Schicksal der Hormon-Rezeptorkomplexe nach der Induktion dieser verschiedenen Synthesen ist bisher nicht viel bekannt. Das spezifisch gebundene tritiierte 17ß-Östradiol hat eine Halbwertszeit von ungefähr 90 Minuten (Gorski und Gannon, 1976).

Über die Regulation der Rezeptorkonzentration in der Zelle ist bisher bekannt, daß es nach Prolaktinstimulierung in den Zellen der Säugerleber zu einem Anstieg der Östrogen-Rezeptorkomplexkonzentration kommt (Chamness et al., 1975). Eine weitere Beobachtung, die von Mester und Baulieu (1975) gemacht wurde, weist darauf hin, daß die Östrogenrezeptorsynthese im Rattenuterus durch Östradiol selbst induziert wird. Auch Brenner et al. (1974) konnten eine Stimulierung der Rezeptorsynthese im Rattenuterus von sich in der ersten Zyklushälfte befindenden Ratten feststellen (also bei einem hohen endogenem Östrogenspiegel). In neueren Arbeiten konnten Seaver et al. (1980) zeigen, daß Progesteron, wenn es als einziges Hormon appliziert wird, im Hühnereileiter zu einem Abfall der Östradiol-Rezeptorkomplexe im Kern und zu einem Abfall der Ovalbumin-m-RNA in den Zellen führte. Bei gleichzeitiger Gabe von Östradiol stieg jedoch der Spiegel der Östradiol-Rezeptorkomplexe im Kern an. Nach den Beobachtungen dieser Arbeitsgruppe führt die in vivo-Gabe einer niedrigen Östradiolkonzentration (bei alleiniger Östrogenapplikation) zu einer Abnahme, die einer hohen Östradiolkonzentration zu einer Zunahme der Rezeptorkomplexe im Kern.

Bei den von mir durchgeführten Ganzzellassays der Hühnereileiterzellen zeigte es sich, daß nach der Vorinkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen DES die MBC der Zellen im Vergleich zur MBC der nicht-vorbeladenen Zellen abgenommen hatte.

Da diese Versuche alle bei einer Inkubationstemperatur von 37° C, also unter Exchange-Bedingungen, durchgeführt wurden, müßte man eigentlich erwarten, daß trotz der Translokation der Hormon-Rezeptorkomplexe in den Kern die maximale Bindungskapazität gleich bliebe, da ja auch die Hormon-Rezeptorkomplexe im Kern mitbestimmt werden. Da dies nicht der Fall ist, sind zwei Erklärungen möglich:

1. Die in den Kern translozierten DES-Rezeptorkomplexe sind aus nicht bekannten Gründen für das tritiierte 17ß-Östradiol nicht zugänglich.

2. Ein Teil der DES-Rezeptorkomplexe wurde innerhalb der 10-minütigen Inkubationszeit mit DES und der sich daran anschließenden Zeit bis zum Beginn der Inkubation mit tritiiertem 17ß-Östradiol (30 Minuten) abgebaut.

Gegen die erste Interpretationsmöglichkeit sprechen die bisher durchgeführten Titrationen von Steroidrezeptoren in isolierten Zellkernen (Clark et al., 1972) und die von mir durchgeführten Titrationen von isolierten Zellen mit anschließender getrennter Auswertung der Bindung in der Cytoplasma- und in der Kernfraktion. Die von Büchli und Keller in letzter Zeit durchgeführten Untersuchungen (1980) zeigten, daß die Anzahl der Bindungsstellen bei Exchange-Bedingungen unabhängig von der zellulären Lokalisation ist.

Bei 37°.C und 30-minütiger Inkubationszeit ist von Williams und Gorski (1973) an isolierten Uteruszellen der Ratte nachgewiesen worden, daß nahezu alle von endogenem Hormon besetzten Rezeptoren (Dexamethason) bestimmt werden konnten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Mester und Baulieu (1975) bezüglich des Östrogenrezeptors des Rattenuterus.

Die in Abbildung 10 dargestellten MBC's lassen sich mit den theoretisch ermittelten MBC's vergleichen, die sich ergeben würden, wenn alle mit DES besetzten Rezeptoren (in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten DES-Konzentration) bei der

nachfolgenden Titration mit tritiiertem 17ß-Östradiol unzugänglich oder abgebaut worden wären.

Nach der Inkubation der Zellen mit DES (s. Abb. 10) zeigte sich, daß die MBC nach der zehnmal höheren DES-Konzentration (1×10^{-8} mol DES/l) nur um einen etwa doppelt so hohen Wert (Abnahme: 10,6 fmol/mg Zellprotein) wie nach der Inkubation mit 1×10^{-9} mol DES/l abgenommen hatte (Abnahme: 6,1 fmol/mg Zellprotein).

Bei der Berechnung der mit DES besetzten Rezeptoren geht man davon aus, daß die scheinbaren Dissoziationskonstanten der Östradiol- und der DES-Rezeptorkomplexe identisch sind. Dabei ist u.a. zu berücksichtigen, daß die Steroidmetabolisierung einen Einfluß auf die Bestimmung der K_d's haben könnte. Die aus den Versuchen und Berechnungen ermittelten Abbauraten für die Rezeptorproteine dürften allerdings trotz der oben erwähnten Problematik, vor allem was die Relation der Abbauraten bei den verschiedenen DES-Konzentrationen zueinander betrifft, gültig sein.

Bei dieser Berechnung geht man wieder von einer abgewandelten Form des Massenwirkungsgesetzes aus:

$$K_d = \frac{[\text{Steroid frei}] \times [\text{Rezeptor frei}]}{[\text{Hormon-Rezeptorkomplexe}]} =$$

$$K_d = \frac{[E - ER] \times [MBC - ER]}{[ER]}$$

Bei dieser Gleichung ist die K_d mit $2{,}1 \times 10^{-9}$ mol/l und die MBC mit $27{,}5 \times 10^{-12}$ mol/l aus den Hühnereileiterversuchen ohne Vorbeladung bekannt (s. Abb. 7).

Bei einer Vorbeladung der Rezeptoren mit 1 x 10^{-9} mol DES/l ergibt sich durch Einsetzen in [E] eine Besetzung von 8,8 pmol Rezeptoren/l. Die MBC der Eileiterzellen müßte also nach der Vorbeladung mit 1 x 10^{-9} mol DES/l 18,7 pmol/l betragen, wenn ein vollständiger Abbau aller besetzten Rezeptoren erfolgt wäre. Unter den in meinen Versuchen gegebenen Exchange-Bedingungen hat die MBC aber nur um 6,1 pmol/l abgenommen, oder anders ausgedrückt, 30 % der besetzten Rezeptoren sind nicht abgebaut worden.

Nach der Vorbeladung mit 1 x 10^{-8} mol DES/l ergibt sich dementsprechend eine errechnete Hormon-Rezeptorkonzentration von 22,7 pmol/l. Die MBC müßte bei dem vollständigen Abbau aller besetzten Rezeptoren 4,8 pmol/l betragen. Die tatsächlich bestimmte MBC beträgt jedoch 16,9 pmol/l. Von den 22,7 pmol/l besetzten Rezeptormolekülen sind demnach 12,1 pmol/l, entsprechend 53 % der besetzten Rezeptoren, noch zu erfassen.

Es wurden also 47 % der von DES besetzten Rezeptoren nach der 1 x 10^{-8} mol DES/l Vorbeladung und 70 % nach der 1 x 10^{-9} mol DES/l Vorbeladung abgebaut.

Der Abbau der Hormon-Rezeptorkomplexe nimmt mit ihrer Konzentration in der Zelle zu. Diese Steigerung des Abbaus ist aber nicht proportional zur Zunahme der Konzentration der besetzten Rezeptoren. Dieses Ergebnis stimmt gut überein mit der von Jensen und Jacobson (1960) gemachten Beobachtung, daß nach der in vivo-Gabe von Östradiol in hohen Dosen dieses Hormon schneller aus dem Rattenuterus verloren geht als nach niedrigen Dosen.

Es fragt sich, ob die Funktion dieses Abbaus im Sinne einer "Down-Regulation" zu verstehen ist, wie sie z.B. bei den Insulinrezeptoren gefunden wurde (Goldfine, 1977). In 3T3-Fibroblasten z.B. wird der Hormon-Rezeptorkomplex abgebaut, vermutlich um die durch ihn bewirkte Stoffwechseländerung in der Zelle nach einiger Zeit wieder rückgängig zu machen (Bojar, 1979).

Der Hormon-Rezeptorkomplex muß dort, wie ein Signal in der Regeltechnik, nach Erfüllung seiner Funktion gelöscht werden, damit sich die Zellen wieder auf neue Stoffwechselgegebenheiten einstellen kann.

Zu den Versuchen an Hühnereileiterzellen wurden Negativkontrollen mit Hühnererythrozyten durchgeführt (s. Abb. 9). Hühnererythrozyten boten sich als Kontrollzellen an, da sie einen Kern besitzen und nach bisherigen Erkenntnissen nicht steroidabhängig sind. Erwartungsgemäß konnte keine spezifische Bindung und damit kein Östrogenrezeptor gefunden werden. Der Nachweis spezifischer Bindung in den Hühnereileiterzellen ist somit kein methodenbedingtes Artefakt, sondern beruht auf dem Vorhandensein spezifischer Östrogenrezeptormoleküle.

Die in Abbildung 9 dargestellten Versuche zeigten eine höhere unspezifische Bindung in den Kernen (im Vergleich zur Bindung im Cytoplasma). Dieses Ergebnis dürfte wesentlich durch die größere Kapazität der Nicht-Rezeptorproteine der Kernfraktion bedingt sein. Diese Proteine, die das tritiierte 17ß-Östradiol mit niedriger Affinität und großer Kapazität binden, sind für einen Großteil der unspezifischen Bindung verantwortlich (Jensen und DeSombre, 1977). Williams und Gorski (1973) erhielten im Gegensatz zu meinen Versuchen an Hühnererythrozyten für die unspezifische Bindung in Rattenuteruskernen eine lineare Funktion in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration. Diese unspezifische Bindung ist nach Meinung dieser Autoren hauptsächlich durch das freie ~~freie~~ tritiierte 17ß-Östradiol, das sich im Kern befindet und durch die Waschvorgänge nicht vollständig entfernt wird, bedingt.

Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe werden durch die Versuche an Hühnererythrozyten (mit der oben dargestellten Abweichung) bestätigt, und es wird gezeigt, daß diese Ergebnisse keine durch die Verwendung isolierter Kerne bedingten Artefakte sind.

Die Ganzzellscatchardanalysen der Eileiterzellen mit getrennter Auswertung der Bindung in der Cytoplasma- und in der Kernfraktion führten zu Ergebnissen, wie sie in Abbildung 8 exemplarisch dargestellt wurden. Bei der Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard (1949) zeigte sich eine prinzipielle Schwierigkeit:

Bei der Titration der Rezeptormoleküle wird zwangsläufig mit steigenden Konzentrationen des tritiierten 17ß-Östradiols eine zunehmende Anzahl von Rezeptoren aus dem Cytoplasma in den Kern transloziert, d.h. die maximale Bindungskapazität des Kernkompartiments nimmt im Verlauf der Titration zu, die des Cytoplasmakompartiments nimmt dagegen ab (dies schließt nicht aus, daß sich nicht hinter dem Kurvenverlauf der Kernfraktion noch eine zusätzliche Bindungskomponente verbergen könnte, die bei höheren Hormonkonzentrationen mehr an Einfluß auf die gesamte Bindung im Kern gewinnt).

In der Darstellung nach Scatchard zeigte sich daher nach der Auftragung der Bindung gegen das Verhältnis des gebundenen zum freien Hormon keine Gerade, sondern eine im Cytoplasma zur Ordinate hin konkave und in der Kernfraktion zur Ordinate hin konvexe Kurve (s. Abb. 8).

Die scheinbaren Dissoziationskonstanten und die MBC's ließen sich, wie unter Ergebnisse II. 2. beschrieben wurde, in beiden Kompartimenten daher nur angenähert errechnen. Dies geschah durch die Extrapolation einer Geraden, die nach der Methode der kleinsten Quadrate durch die Punkte gelegt wurde (Martin et al., 1975).

Die bei Tabelle 1 wiedergegebenen angenäherten MBC's verhalten sich wie 1 zu 10 (Cytoplasma zu Kernfraktion) zu einander. In einem Teil der Fälle ist mit der Ganzzellassay-Technik keine spezifische Bindung mehr im Cytoplasma nachzuweisen. Hier ist vermutlich die Translokation (zumindest für die Empfindlichkeit der Ganzzellassay-Methode) der Rezeptoren aus dem Cytoplasma in die Kerne vollständig abgelaufen.

Diese Verhältnisse der spezifischen Bindung in der Cytoplasma- zur Kernfraktion stimmen gut überein mit den von verschiedenen Arbeitsgruppen gemachten Beobachtungen (Gorski et al., 1968; King et al., 1965; Boylan und Wittliff, 1975; Kyser und Thesis, 1970). Jensen und DeSombre (1977) fanden in DMBA-induzierten Mammakarzinomen von Ratten 85 - 90 % des Anteils der spezifischen Bindung in den Kernen. In Rattenuteruskernen waren es 70 bis 80 % der Gesamtbindung. Nach Munck und Wira (1975), die Untersuchungen an intakten Lymphozyten durchgeführt haben (allerdings bezüglich des Glucocorticoidrezeptors), steigt die Bindung im Kern proportional zur totalen Zellbindung an.

Diese Forschungsgruppe fand nach der Inkubation der Zellen bei 37° C bis zu 100 % der spezifisch gebundenen Radioaktivität der gesamten Zelle im Kern. Bloom et al. (1980) fanden 40 - 60 % der Glucocorticoidrezeptoren im Kern (Inkubation von isolierten intakten Leberzellen. Die K_d's lagen in beiden Kompartimenten im 10^{-9} mol/l-Bereich). Büchli und Keller (1980) fanden nach der in vivo-Gabe von tritiiertem 17ß-Östradiol mindestens 80 % der Rezeptoren im Kernkompartiment von Rattenuteruszellen. Ähnliche Werte erhielten Williams und Gorski (1972) bei Untersuchungen an Rattenuteruszellen.

Diese unterschiedlich hohen Werte sind sicher z.T. auf die unterschiedlich hohen 17ß-Östradiolkonzentrationen und, wie oben gezeigt wurde, auf die daraus resultierenden unterschiedlichen Abbauraten zurückzuführen.

Nach der 10-minütigen Vorbeladung der Zellen mit 1 x 10^{-8} mol DES/l nahmen die maximalen Bindungskapazitäten ab, wie es sich auch schon bei den Vorbeladungsversuchen, bei denen keine Auftrennung der Zellen in eine Cytoplasma- und Kernfraktion erfolgte,zeigte. Diese Abnahme war sowohl im Cytoplasma als auch in der Kernfraktion zu sehen. Die spezifische Bindung, deren Größe aufgrund der "Krümmung" nur angenähert errechnet werden konnte, hat in beiden Zellkompartimenten um etwa den gleichen Betrag wie bei den Versuchen ohne Auftrennung abgenommen (bezogen auf die nicht-vorbeladenen Zellen, s. Abb. 8 und 10).

Die stärkere "Krümmung" der Kurven in der Cytoplasma- und in der Kernfraktion nach der Vorbeladung (im Vergleich zu der "Krümmung" ohne Vorbeladung, s. Abb. 8) läßt sich dahingehend verstehen, daß nach dem Abbau eines Teils der Rezeptoren die Titration des verbliebenen Teils mit der gleichen Konzentration des tritiierten 17ß-Östradiols zu einer prozentual höheren Translokation (bezogen auf die in der Zelle zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Rezeptoren) führt.

Über welchen Mechanismus die Steuerung des Abbaus vor sich geht und durch welche Enzymsysteme er katalysiert wird, ist eine Frage, die noch nicht beantwortet werden kann.

III. Translokationsstudien an Eileiterzellen

Die zeitliche Abhängigkeit der Hormon-Rezeptorbindung in der Cytoplasma- und der Kernfraktion wurde bestimmt durch kontinuierliche Beladung der Zellen mit tritiiertem 17ß-Östradiol in konstanter Konzentration.

Um den Anteil der Rezeptorneusynthese abschätzen zu können, wurden Hemmstoffe der Transkription und Translation eingesetzt. Zur Hemmung der Transkription wurde α-Amanitin verwendet, das spezifisch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II hemmt (Lindell et al., 1970). Die Translation wurde durch Puromycin gehemmt, das aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Aminosäure-tragenden t-RNA-Molekülen die Bindung dieser Moleküle an die Anheftungsstellen der Ribosomen hemmt (Hartmann et al., 1968; Allen und Zamecnik, 1962). In Konzentrationen von 1 mmol/l hemmt Puromycin nach Palmiter (1972) 95 % aller in der Hühnereileiterzelle ablaufenden Proteinsynthesen. In den hier vorgestellten Versuchen mit isolierten Hühnereileiterzellen waren 300 mmol/l nötig, um 92 % aller Proteinsynthesen zu hemmen.

Das bei diesen Versuchen zu beobachtende erste spezifische Bindungsmaximum ist weder mit Puromycin noch mit α-Amanitin

zu hemmen. Daraus folgt, daß die spezifische Bindung in diesem Zeitraum an Rezeptorproteine erfolgte, die zum größten Teil schon vor Versuchsbeginn in den Zellen vorhanden waren.

Auch ein verzögertes Einsetzen des Hemmeffekts kann dieses Verhalten nicht erklären, da, wie schon im Kapitel Ergebnisse dargelegt wurde, die Hemmung nahezu aller Proteinsynthesen in der Zelle wenige Minuten nach der Applikation der Hemmsubstanzen mit den Einbauraten von (U-^{14}C) L-Leucin nachgewiesen wurde. Auch Lindell et al. (1970) geben an, daß der Hemmeffekt des α-Amanitins wenige Minuten nach der Hinzugabe zu isolierter DNA vollständig vorhanden war. Eine Verlängerung der Zeit zwischen der Inkubation der Zellen mit den Hemmsubstanzen und dem Beginn der eigentlichen Inkubation führte in meinen Versuchen ebenfalls nicht zu einer Hemmbarkeit des 1. Peaks.

Die Höhe des 1. Peaks bei den atrophischen Eileitern der sich in einem ovariell inaktiven Stadium befindenden Hühner ist, sowohl in der Cytoplasma- als auch in der Kernfraktion, kleiner als bei den Eileitern der Legehühner (s. Ergebnisse V.).

Da die Synthese des Östrogenrezeptors durch die Östrogen-Rezeptorkomplexe selbst induziert wird (Mester und Baulieu, 1975; Brenner et al., 1974), unterstützt dies die These, daß der 1. Peak nur durch die zu diesem Zeitpunkt in den Zellen zur Verfügung stehenden Rezeptoren und deren Hormonbindung bedingt ist.

Bei einer niedrigen endogenen Östrogenkonzentration im Blut liegt der Östrogen-Rezeptorspiegel in den Zellen bei einem niedrigen Wert. Seine Höhe ist, wie sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt, wohl das Resultat zumindest zweier gegenläufiger Mechanismen: des Abbaus, der bei niedrigen Konzentrationen an Hormon-Rezeptorkomplexen niedriger als bei einer hohen Konzentration ist, und der Synthese von Rezeptoren, die bei niedrigen Hormon-Rezeptorkomplex-Konzentrationen im Vergleich zu höheren Konzentrationen vermindert ist.

Weitere Mechanismen, die die Höhe des Hormon-Rezeptorspiegels beeinflussen können, werden weiter unten diskutiert. Der Östrogenrezeptorspiegel ist bei niedrigen endogenen Östrogenspiegeln, über einen längeren Zeitraum betrachtet, niedriger als bei hohen (s. Höhe des 1. Peaks bei den atrophischen Eitern).

Zur Atrophie des Eileiters ist zu sagen, daß es schon seit längerer Zeit bekannt ist, daß die ovarielle Aktivität des Huhnes sehr leicht durch äußere Einflüsse zu stören ist. So hat Nalbandov (1976) z.B. festgestellt, daß Futterentzug zu einem sofortigen Legestop und nach 6 Tagen zu einem atrophischen Eileiter führt. Diese Atrophie ist nach Nalbandov ein sicherer Hinweis darauf, daß der endogene Östrogenspiegel und damit die Proliferationswirkung der Östrogene auf den Eileiter niedrig ist.

Nach dem 1. Bindungsmaximum der spezifisch gebundenen Radioaktivität trat trotz kontinuierlicher Inkubation der Zellen mit tritiiertem 17ß-Östradiol ein Abfall der spezifischen Bindung in der Cytoplasma- und in der Kernfraktion auf. Dieser Abfall, der im Sinne der Vorbeladungsversuche als Abbau eines Teils der Hormon-Rezeptorkomplexe zu verstehen ist (s. Abb. 8 und 10), trat im Kernkompartiment nahezu zeitparallel zu dem Abfall in der Cytoplasmafraktion auf.

Danach schloß sich der 2. Peak der spezifisch gebundenen Radioaktivität im Cytoplasma und in den Kernen an. Ein ähnliches zweites Bindungsmaximum nach vorheriger Abnahme der Bindung fand Dittmann (1977) bei Untersuchungen über den Dexamethasonrezeptor in den Kernen von isolierten Nierentubulizellen (nach kontinuierlicher Inkubation der Zellen bei 30° C), ohne dafür jedoch eine Erklärung zu finden.

Dieser 2. Peak ist im C Y T O P L A S M A zum größten Teil mit Puromycin (80 % Hemmung bei 9 nmol/l tritiiertes 17ß-Östradiol), aber nur gering mit α-Amanitin (30 % Hemmung bei 9 nmol/l tritiiertes 17ß-Östradiol) hemmbar. Die Differenz

zwischen der Höhe des Rezeptorspiegels nach der Puromycin- und nach der α-Amanitin-Hemmung deutet auf den Anteil der Rezeptorsynthese hin, der von schon vor Versuchsbeginn in den Zellen vorhandener m-RNA abzuleiten ist (s. Abb. 13). Die Möglichkeit einer Hemmung auf der Transkriptionsebene nach einem so kurzem Zeitraum wird unterstützt durch die Beobachtung, daß die m-RNA-Synthese im Hühnereileiter schon sehr schnell nach der Östradiolgabe beeinflußt wird (Tata, 1976; Kalimi et al., 1976).

Schon Palmiter (1975) vermutete die Existenz von inaktiver m-RNA im Hühnereileitercytoplasma, die nach der Zugabe von Östradiol aktiviert werden würde. Der Mechanismus, über den Steroide die Translation steuern könnten, ist bisher nicht bekannt.

Palmiter beobachtete, daß nach Östradiolapplikation die Initiation der Polypeptide, ihre Elongation und die Größe der Polysomen im Cytoplasma der Zellen des Hühnereileiters zunahmen (1972). Liang und Liao (1975) fanden, daß z.B. Androgene nach 10-minütiger Inkubation von Prostatagewebe der Ratte einen aktivierenden Effekt auf ein Methionyl-t-RNA bindendes Protein hatten, das nach Ansicht dieser Autoren mit der Proteinsyntheseinitiation zu tun hatte. Diese Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, wie eine direkte Beeinflussung der Translation durch Östrogene ablaufen könnte.

Der nicht-puromycinhemmbare Anteil der Bindung im Bereich des 2. Peaks (s. Abb. 13) bleibt in der Cytoplasmafraktion über den ganzen Konzentrationsbereich des tritiierten 17ß-Östradiols (1 - 10 nmol/l) nahezu konstant. Es ist unwahrscheinlich, daß es sich bei dieser Bindung nur um noch nicht abgebaute Hormon-Rezeptorkomplexe handelt, da der Abbauvorgang, wie unter Ergebnisse III. 1. gezeigt wurde, ein sehr schnell ablaufender Prozeß ist. Dieser Abbauprozeß wurde außerdem noch durch die Östradiolapplikation in der kontinuierlichen Inkubation verstärkt (s. Diskussion II.).

Auch eine unvollständige Hemmung der Translation durch zu niedrige Puromycin-Konzentrationen ist auszuschließen, da nach der Puromycingabe 92 % aller in den Zellen ablaufenden Proteinsynthesen blockiert waren und der Anteil der nicht-puromycinhemmbaren Bindung größer als 8 % war (s. Abb. 13).

Bei diesem nicht-puromycinhemmbaren Anteil der Rezeptorneusynthese kann es sich um Rezeptoren handeln, die nach der Translokation in den Kern nicht abgebaut worden sind, sondern zwischen Kern und Cytoplasma rezirkulieren (Recycling). Dies alleine würde allerdings nicht den starken Anstieg der nicht-puromycinhemmbaren Bindung bei höheren Hormonkonzentrationen im Kern erklären, da dieser Anstieg im Cytoplasma nicht zu sehen ist. Bei der Annahme der Hypothese eines Recyclings würde das bedeuten, daß der Anteil der am Recycling teilnehmenden Rezeptoren, die ja auch im Cytoplasma zu erfassen sind, über den gesamten Konzentrationsbereich des tritiierten 17ß-Östradiols konstant bleibt.

Eriksson et al. (1980) sind der Ansicht, daß der Typ I-Binder des Östradiols in Rattenuteruszellen über den Kern wieder ins Cytoplasma rezirkulieren und dort den Östrogenrezeptorbestand wiederauffüllen könne (s. weiter unten).

Als weitere Erklärungsmöglichkeit böte sich die Annahme eines postribosomalen Processings der Rezeptormoleküle an, die dabei von einer inaktiven (keine Steroidbindung und keine Translozierbarkeit) in eine aktive Form überführt werden würden. Der konstante, durch Puromycin nicht zu hemmende Bindungsanteil wäre dann das Resultat eines Fließgleichgewichts zwischen dieser "ribosomenunabhängigen" Synthese der Rezeptoren im Cytoplasma und ihrer Translokation als Östrogen-Rezeptorkomplexe in den Kern.

Dies würde auch eine Zunahme der nicht-puromycinhemmbaren Bindung im Kernkompartiment bei hohen Hormonkonzentrationen erklären, da dann die MBC des Kernkompartiments durch die vermehrte Translokation von Hormon-Rezeptorkomplexen zunehmen würde. Dieser Effekt wird dann noch durch die prozentual ver-

ringerte Abbaurate verstärkt, die bei der Inkubation der Hühnereileiterzellen mit hohen Hormonkonzentrationen gefunden wurde (s. Abb. 10). Für diesen Mechanismus bestünden dann Schwellenwerte, oberhalb derer dieses postribosomale Processing verstärkt einsetzt (über 7,5 - 8,0 nmol/l tritiiertes 17ß-Östradiol bei den in Abbildung 13 wiedergegebenen Versuchen).

Welcher dieser beiden Interpretationsversuche der Wahrheit am nächsten kommt, oder ob beide Mechanismen in der Zelle vorkommen, läßt sich nicht mit Bestimmtheit beantworten. Das Zusammenspiel aller Faktoren in der Zelle besitzt eine Komplexität, die auch die Möglichkeit anderer Denkmodelle offen läßt.

Es läßt sich jedoch sagen, daß die Zunahme der spezifischen Bindung nach Hormonstimulierung in der Cytoplasmafraktion vor allem auf der Neusynthese von Rezeptoren durch Translation von schon vor Beginn der Hemmung in der Zelle vorhandener m-RNA zustande kommt (Differenz zwischen der Bindung nach α-Amanitin- und nach Puromycin-Hemmung). Der transkriptionsabhängige Anteil der Rezeptorsynthese ist im Cytoplasma bei niedrigen Hormonkonzentrationen klein (Differenz zwischen der Bindung ohne Hemmsubstanz und der Bindung nach α-Amanitin-Hemmung) und erreicht erst bei größeren Hormonkonzentrationen einen ähnlich hohen Wert wie der Anteil der Rezeptorsynthese durch präexistente m-RNA.

In der K E R N F R A K T I O N überwiegt bei nahezu allen Hormonkonzentrationen die nicht-puromycinhemmbare Bindung im Bereich des 2. Peaks, die bei hohen Hormonkonzentrationen (über 7,5 nmol/l) sogar rapide ansteigt. Der Anteil der spezifischen Bindung, der über die Transkription und die Translation von m-RNA bereitgestellt wurde, hatte in diesem Kompartiment bis zu Hormonkonzentrationen von 7,5 nmol/l tritiiertes 17ß-Östradiol einen nahezu konstanten Wert, um auch darüberhinaus nur unwesentlich anzusteigen. Es ist nicht auszuschließen, daß der überproportionale Anstieg der 17ß-Östradiol-Bindung oberhalb von ca. 7,5 nmol/l auf eine direkte Interaktion zwischen Hormon und Kernstrukturen zurückzuführen ist (siehe weiter unten).

Sarff und Gorski (1971) kamen bei in vivo-Versuchen an Rattenuteri (in denen sie als einmalige Dosis 0,1 µg Östradiol/Tier applizierten) zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich einer Wiederauffüllung des Rezeptorspiegels im Cytoplasma, nachdem die Bindung bei 30 Minuten nach der Hormongabe ein Minimum durchlaufen hatte. Nach der Anwendung der Proteinsynthese-Hemmsubstanz Cycloheximid kamen sie zu dem Ergebnis, daß über die Proteinsynthese innerhalb der ersten 6 Stunden nach der in-vivo-Hormongabe nahezu alle Rezeptoren bereitgestellt werden. Nach dieser Zeit kam es in diesen Versuchen über eine Aktivierung oder Demaskierung eines Rezeptorvorläufermoleküls, die dann vermehrt in Erscheinung trat, zu einem weiteren Anstieg der Bindung.

Die Ergebnisse dieser in vivo-Versuche stimmen im Wesentlichen mit den von mir durchgeführten Versuchen überein (s. Abb. 11, 13 und 14), obwohl in den Versuchen mit den Hühnereileiterzellen nach dem Erreichen des 2. Bindungsmaximum immer ein deutlicher Abfall der Bindung zu sehen war, der, wie oben gezeigt, nicht auf eine nachlassende Vitalität der Zellen zurückzuführen ist [s. (U-^{14}C) L-Leucin-Einbau nach 6 Stunden Inkubationszeit]. Die spezifische Bindung wurde in dieser Arbeit außerdem nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Hormongabe ausgewertet wie bei Sarff und Gorski, sondern innerhalb des Zeitraumes bestimmt, der 50 Minuten vor und 50 Minuten hinter dem 2. Bindungsmaximum lag (also zwischen 60 und 250 Minuten nach Hormonzugabe, s. Abb. 12).

Mester und Baulieu (1975) kamen unter ähnlichen Versuchsbedingungen wie Sarff und Gorski zu konträren Ergebnissen. Nach diesen Autoren ist innerhalb der ersten 6 Stunden die Wiederauffüllung des cytoplasmatischen Rezeptor-Pools hauptsächlich Folge einer Reaktivation (=Recycling) und/oder Demaskierung von Cytosolrezeptoren, die nicht durch Cycloheximid blockiert werden kann. Nach mehr als 6 Stunden Inkubationszeit ist die spezifische Bindung, abhängig von der Hormonkonzentration (nach 0,1 µg/Tier weniger als nach 1 µg Östradiol/Tier), durch Cycloheximid hemmbar.

Dies ist auch konträr zu den Ergebnissen, die bei den Versuchen mit den Hühnereileiterzellen gewonnen wurden. Die Tendenz, daß bei hohen Hormonkonzentrationen prozentual mehr Rezeptoren durch Neusynthese über die Ribosomen bereitgestellt werden, war auch in meinen Versuchen zu sehen (s. Abb. 13).

Die spezifische Bindung im Kern hat nach Mester und Baulieu ein Maximum nach 30 bis 60 Minuten erreicht (wobei allerdings keine kurzfristigen Bindungsbestimmungen direkt nach der Hormongabe durchgeführt wurden), um dann linear bis zu 7 Stunden hin abzufallen. Dies entspricht in etwa dem bei den Eileiterzellen beobachteten 1. Peak. Der von mir gesehene 2. Peak war bei den Untersuchungen von Mester und Baulieu nicht zu sehen.

Seaver et al. (1980) fanden bei in vivo-Studien am Hühnereileiter, nach einem nur schwach ausgeprägten 1. Bindungsmaximum in den Kernen kurz nach der 2. Hormongabe, einen Abfall der Bindung mit einem erneuten Anstieg nach 75 Minuten, der nach 2 Stunden sein Maximum erreichte und danach wieder auf seinen Normalwert abfiel. Dieses 2. Maximum, das zeitlich mit dem von mir beobachteten 2. Bindungsmaximum im Kern gut übereinstimmt, trat nur nach Gabe von 2 mg Östradiolbenzoat auf (als 2. Hormondosis nach einer 12 Stunden vorher stattgefundenen Stimulierung der ovarektomierten Hühner mit 2 mg Östradiolbenzoat). Bei einer 2. Hormongabe von 0,5 mg Östradiolbenzoat fiel dagegen die spezifische Bindung im gleichen zeitlichen Bereich unter die des Kontrollwerts (= keine Hormongabe) ab.

Dies stimmt mit den bei den Eileiterzellen im Rahmen dieser Arbeit gemachten Versuchen überein, bei denen ein ähnlicher 2. Peak beobachtet wurde. Die niedrige Bindung im Bereich des 1. Peaks bei den von Seaver et al. durchgeführten Versuchen ist aus den bisherigen Ergebnissen erklärbar. Bei den verwendeten Hühnern handelte es sich um Hühner, die ovarektomiert worden waren und deshalb mit den atrophischen Eileitern dieser Arbeit zu vergleichen sind. Diese wiesen einen ähnlich niedrigen 1. Peak in der Kernfraktion auf. Bei allen Gemeinsamkeiten fanden Seaver et al. jedoch kaum Schwankungen der spezifischen Bindung im Cytoplasma des Eileiters, wie sie bei den in dieser Arbeit wiedergegebenen Versuchen bei 37° C auftraten.

Die in vivo-Versuche mit einmalig gegebenen Hormonkonzentrationen lassen sich nicht ohne weiteres mit den Versuchen an intakten isolierten Einzelzellen vergleichen (Einzelzellen, kontinuierliche Hormoninkubation, z.T. andere Zielgewebe oder ovarektomierte Hühner). Trotzdem zeigen sich Gemeinsamkeiten, aber auch Widersprüche zwischen den Versuchen mit den Eileiterzellen und den hier vorgestellten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen.

Der zweite Peak bei den Versuchen an Zellen aus dem Hühnereileiter wies nicht nur eine Abhängigkeit seiner Größe von der eingesetzten Hormonkonzentration auf, sondern auch eine Abhängigkeit in seinem zeitlichen Auftreten (s. Abb. 12). Dabei verschiebt sich das Maximum des 2. Peaks bei Hormonkonzentrationen über 5 nmol/l (tritiiertes 17ß-Östradiol) sowohl im Cytoplasma als auch in der Kernfraktion zu späteren Zeiten hin.

Weiterhin fällt auf, daß bei hohen tritiierten 17ß-Östradiolkonzentrationen der 2. Peak in der Kernfraktion früher oder zumindest gleichzeitig mit dem 2. Peak im Cytoplasma zu sehen ist, obwohl das, wie oben schon einmal erwähnt, der Vorstellung widerspricht, daß die im Kern nachweisbare Bindung ausschließlich auf dem Vorhandensein von Hormon-Rezeptorkomplexen beruht, die durch Translokation aus dem Cytoplasma dorthin gelangt sind. Denn dann müßte man erwarten, daß das Bindungsmaximum in der Cytoplasmafraktion über den gesamten Konzentrationsbereich des tritiierten 17ß-Östradiols früher als in der Kernfraktion zu sehen wäre.

Dieses Ergebnis stützt die oben schon erwähnte These, daß die starke Bindungszunahme im Kernkompartiment bei hohen Hormonkonzentrationen (s. Abb 13) zumindest zu einem Teil auf eine direkte Interaktion zwischen Hormon und Kernstrukturen zurückzuführen ist.

Eine diese Verhältnisse ausreichend erklärende Interpretation böte die Annahme einer zweiten Klasse von Kernrezeptoren, wie sie Eriksson et al. (1980) in neuester Zeit in den Kernen von Rattenuteruszellen gefunden haben.

Diese Typ II-Kernrezeptoren, die eine physiologische Funktion zu besitzen scheinen, binden direkt Östradiol (K_d = 1,6 - 2,0 x 10^{-9} mol/l). Sie zeigen im Gegensatz zu Typ I-Bindern (K_d = 0,8 x 10^{-10} mol/l), die durch Translokation aus dem Cytoplasma in den Kern gelangt sind, ein kooperatives und nicht unabhängiges Bindungsverhalten. Dies schlägt sich in einer sigmoidalen Kurve nieder, wenn die Hormonkonzentration gegen die spezifische Bindung im Kern aufgetragen wird.

Die Überlagerung dieser Bindung des Typ I- und des Typ II-Binders ergibt eine ähnliche Kurve, wie sie bei den Hühnereileiterzellen für das 2. Bindungsmaximum im Kern gefunden wurde (s. Abb. 13). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Bindung nicht zu konstanten Zeitpunkten, wie bei den Versuchen mit den Rattenuteruskernen, ermittelt wurde, sondern zum Zeitpunkt der maximalen Bindung bei kontinuierlicher Hormoninkubation.

Unter 10 nmol/l Östradiol ist der Einfluß des Typ II-Binders auf die Gesamtbindung nur gering. Dabei ist der Verlauf dieser Gesamtbindung nach Eriksson et al. jedoch stark von unbekannten Faktoren abhängig. Der abrupte Anstieg der Bindung in der Kernfraktion des Hühnereileiters ist der Bindung in den Rattenuteruskernen,die diese Arbeitsgruppe bei 37° C fand, sehr ähnlich. Bei 4° C fand die Bindung des Hormons in den Rattenuteruskernen nur an den Typ I-Binder des Kerns statt. Die Bindung hatte dann die Form einer normalen sigmoidalen Kurve ohne Zwischenplateau.

Eriksson et al. fragten sich in ihrer Arbeit, ob dieser Typ II-Binder durch Neusynthese oder über die Aktivierung von Vorstufen (bei hohen Hormonkonzentrationen) in den Kern kommt. Für den Hühnereileiter wäre diese Frage im Sinne eines Processings von Rezeptorvorläufern zu beantworten (s. Abb. 13).

Auch der Verlauf des zur Ordinate hin konvexen Scatchardplots (s. Abb. 8) widerspricht der Annahme eines Typ II-Binders, der bei hohen Hormonkonzentrationen Einfluß auf die Bindung gewinnt, nicht. Für einen zweiten Typ von cytoplasmatischen Rezeptoren, wie er von Eriksson et al. bei den Rattenuterus-

zellen gefunden wurde, gibt es beim Hühnereileiter keine Hinweise.

IV. Scatchardanalysen an isolierten Mammakarzinomzellen

Bei diesen Versuchen ging es darum, die bei den Hühnereileiterzellen erarbeiteten Methoden, soweit dies möglich war, auf das Mammakarzinomgewebe zu übertragen und gegebenenfalls einen für die Routinediagnostik anwendbaren Ganzzellassay zu entwickeln. Der Hühnereileiter bot sich außer aus den oben angeführten Gründen auch deshalb für grundlegende Untersuchungen an, da nach Tata (1976) eine prinzipielle Ähnlichkeit zwischen dem Östrogenrezeptor im Hühnereileiter und dem im Mammakarzinomgewebe besteht.

Die Ergebnisse der Scatchardanalysen von vier Mammakarzinomen, von denen nach Anwendung der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation und der Dextrankohle-Methode drei Tumoren als negativ und einer als rezeptorpositiv anzusehen sind, führten zu Scatchardanalysen wie dem in Abb. 15 exemplarisch gezeigten.

Im Gegensatz zu den Scatchardanalysen mit Auftrennung in Cytoplasma- und Kernfraktion bei den Hühnereileiterzellen, zeigten sich bei den Mammakarzinomzellen der drei nach der Routine-Methode negativen Tumoren keine gekrümmten, sondern lineare Scatchardplots. Für dieses Verhalten, das wegen des geringen Anzahl der Versuche nicht als repräsentativ hingestellt werden soll, gibt es verschiedene Interpretationsmöglichkeiten:

1. Da der Scatchardplot nur aus vier Titrationspunkten besteht, läßt es sich nicht ausschließen, daß eine geringe Krümmung, die die Auswertung aber nicht grundlegend verändern würde, übersehen wird.

2. Synthese, Translokation und Abbau in der Zelle und/oder Rezirkulation der Rezeptoren stehen im Gleichgewicht, so daß bei der Titration der Rezeptoren im Cytoplasma ein Ausgleich

für die in den Kern translozierten und abgebauten Rezeptoren stattfindet.

3. Die Translokation der sich im Cytoplasma befindenden Rezeptoren ist gestört. Bei der Titration werden die im Cytoplasma und im Kern (siehe Mammakarzinome mit Kernrezeptoren, Zava et al., 1974, 1977) vorhandenen Rezeptoren so bestimmt, als wenn es sich um zwei voneinander unabhängige Kompartimente handelte. Für diese Möglichkeit spricht, daß bei der Patientin E.W. die MBC im Cytoplasma größer, bei den anderen Patientinnen etwa gleich groß wie die MBC in der Kernfraktion ist. Bei ungestört ablaufender Translokation sollte man erwarten, daß sich in Analogie zu den Versuchen bei den Legehühnern nach der einmaligen Hormongabe der größte Teil der Bindung in der Kernfraktion nachweisen ließe. Es ist also denkbar, daß bei diesen hier untersuchten Tumoren eine Störung auf der Translokationsebene vorliegt, die dazu führt, daß die Synthesesteigerung als Anwort auf die Hormongabe ausbleibt, und daher die relativ niedrige MBC dieser Tumoren bedingt.

Die Ursache des linearen Verlaufs der Scatchardanalysen kann nicht in der, im Vergleich zu den Hühnereileiterzellen, niedrigeren MBC der Mammakarzinomzellen liegen, da dann die Rezeptorbestimmung bei gleichen 17ß-Östradiolkonzentrationen zu einer sogar noch stärker ausgeprägten Krümmung im Scatchardplot führen müßte.

Bei der vierten, nach der Routinediagnostik rezeptorpositiven, Patientin ist die gesamte Bindung im Kernkompartiment zu finden. Die Translokation der Hormon-Rezeptorkomplexe ist in diesem Fall sicher positiv. Ein ähnliches Verhalten war bei den Translokationsversuchen mit Hühnereileiterzellen (mit getrennter Auswertung der Bindung in Cytoplasma- und Kernkompartiment) nur einmal zu beobachten (s. Tabelle 1). Ob dieses Verhalten für alle hormonsensiblen Mammakarzinome typisch ist, oder ob es sich hierbei um einen Defekt in der Rezeptorsynthese handelt, der dazu führt, daß der Tumor auf eine endokrine Therapie

eventuell nicht anspricht, läßt sich erst nach weiteren Versuchen sagen.

Die Vorteile der hier vorgestellten Ganzzellassay-Technik gegenüber der Dextrankohle-Methode lassen sich anhand der untersuchten Mammakarzinome (s. Tabelle 2) wie folgt zusammenfassen:

1. Bei den ersten drei Tumoren zeigte sich, daß nur mit Hilfe der Ganzzellassay-Technik exakte D a t e n i m G r e n z b e r e i c h (wie MBC und K_d) bestimmt werden konnten. In diesem Grenzbereich zeigte sich dagegen im Routineassay mit der Dextrankohle-Methode nur ein Scatchardplot mit unsättigbarer Bindung. Die Daten über das Bindungsverhalten der Rezeptoren konnten außerdem in dem physiologischen Zellmilieu und bei physiologischer Temperatur bestimmt werden.

2. Es fällt besonders bei den beiden Prämenopausepatientinnen auf, daß ihre Tumoren eine mehr als doppelt so hohe MBC wie die der Postmenopausepatientin E.W. aufwiesen, obwohl alle drei Tumoren unter Nicht-Exchange-Bedingungen rezeptornegativ waren. Es scheint also ein Teil der Rezeptoren bei Prämenopausepatientinnen mit e n d o g e n e m H o r m o n besetzt zu sein, der erst unter Exchange-Bedingungen (37° C) im Scatchardplot sichtbar wird. Dies wird bestätigt durch Legha et al. (1978), die bei Postmenopausepatientinnen unter Nicht-Exchange-Bedingungen im Cytosol höhere Rezeptorkonzentrationen als bei Prämenopausepatientinnen fanden. Auch nach Rosen et al. (1977) kann das endogene Hormon die MBC der Karzinome, die mit der Dextrankohle-Methode ermittelt wurden, beeinflussen. Savlov et al. (1974) fanden signifikant höhere Rezeptorspiegel im Cytosol von Postmenopausepatientinnen als bei Prämenopausepatientinnen. Trams und Maass (1977) konnten von 35 Prämenopausepatientinnen nur 13, von 81 Postmenopausepatientinnen aber 34 als rezeptorpositiv einstufen.

   Diese mögliche Fehlerquelle gewinnt weiter an Bedeutung durch die Entdeckung von Mammakarzinomen, die selbst zur Östrogen-

synthese fähig sind (Miller und Forrest, 1974).

Fishman et al. (1977) sind jedoch nach den von ihnen durchgeführten Versuchen zu der Überzeugung gekommen, daß es bei einem hohen endogenen Östron- und Östradiolspiegel über eine Synthesesteigerung auch zu einem hohen Rezeptorgehalt im Cytoplasma kommt und deshalb Fehler in der Routineassay-Methode nicht zu erwarten seien. Nur bei Spiegeln über 200-400 pg/ml Östradiol sei nach Angabe dieser Autoren mit falschnegativen Ergebnissen zu rechnen. Diese Ergebnisse, die mit der beim Hühnereileiter gefundenen positiven Rückkopplung übereinstimmen, schließen also die Möglichkeit eines fälschlich erfolgenden Ausschlusses eines hormonabhängigen Tumors von der endokrinen Therapie nicht aus.

3. Eine weitere potentielle Fehlerquelle der bisher angewandten Routine-Methoden ist, daß die Mehrzahl der Rezeptoren in Form von H o r m o n - R e z e p t o r k o m p l e x e n i m K e r n und nicht im Cytoplasma lokalisiert sind. Gorski et al. (1968) fanden im Uterus von Prämenopausepatientinnen bis zu 90 % der Rezeptoren im Kern der Zellen. Die beiden von mir untersuchten Tumoren von Prämenopausepatientinnen besaßen 51 bzw 54 % der in der Zelle vorhandenen Rezeptoren im Kernkompartiment. Dies weist auf die Bedeutung dieser möglichen Fehlerquelle hin.

4. Mammakarzinome, die Ö s t r o g e n r e z e p t o r e n a u s s c h l i e ß l i c h i n d e n K e r n e n besitzen, wie sie von Zava et al. (1974) entdeckt wurden, können bei der Anwendung der Dextrankohle-Methode und der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation zu falschnegativen Ergebnissen führen. Auch bei Mammakarzinomen, die zusätzlich zu den cytoplasmatischen Rezeptoren Binder im Kern besitzen, die dort nicht durch Translokation hin gelangt sind, wie sie von Zava et al. (1977) in MCF-7 Tumorzellen gefunden wurden, können diese Rezeptoren mit der Ganzzellassay-Technik erfaßt werden. Anderson et al. (1973) fanden auch in Biopsien von menschlichen Mammakarzinomen Hinweise auf weitere Bin-

dungskontingente im Kern. Es bleibt noch zu klären, ob diese Binder eine physiologische Funktion in der Zelle zu erfüllen haben, wie sie z.B. von Eriksson et al. (1980) für den in Rattenuteruszellen gefundenen Typ II-Binder des Kerns nachgewiesen wurde (nach Anderson et al., 1972, machen die Kernrezeptoren in Rattenuteruszellen 20 - 30 % der insgesamt in den Zellen vorhandenen Rezeptoren aus).

5. Mit Hilfe der Ganzzellassay-Technik läßt sich die Fähigkeit der cytoplasmatischen Rezeptoren zur T r a n s l o k a t i o n abschätzen. Dazu ist es jedoch erforderlich, das Normalverhalten der Rezeptoren aus Mammakarzinomen besser zu kennen, als es nach den wenigen hier dargestellten Ganzzellscatchardplots der Fall ist. Dann ist zu hoffen, daß falschpositive Ergebnisse, bei denen eine zeitlich hinter der Hormon-Rezeptorbindung liegende Läsion vermutet wird (s. McGuire, 1975a), wenigstens teilweise vermieden werden können.

Es bleibt abzuwarten, ob mit Hilfe der Ganzzellassay-Technik und ihrer methodischen Vorteile die Prognostizierbarkeit hinsichtlich eines endokrinen Therapieerfolges verbessert werden kann.

Die Nachteile dieser Technik liegen vor allem in dem größeren Zeitaufwand bei der Herstellung der Zellsuspension und darin, daß ein Einfrieren der Mammakarzinome, um diese zu einem späteren Zeitpunkt aufzuarbeiten, nicht möglich ist, da bei diesem Vorgang die Zellen zerstört werden. Ein weiterer limitierender Faktor ist das für einen Vier-Punkte-Scatchardplot erforderliche Mindestfeuchtgewicht von 3 Gramm. Weiterhin sollte untersucht werden, ob durch die Zellisolierung auch eine Selektion der Zellen hinsichtlich des Rezeptorgehalts vorgenommen wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit einer kombinierten mechanischen und enzymatischen Methode konnten aus dem Hühnereileitergewebe Zellen verschiedener Subtypen isolierte werden: Drüsenzellen, Gobletzellen, Epithelzellen mit Zilienbesatz und Muskelzellen. Die Ausbeute betrug 35 bis 40 % des Gewebefeuchtgewichts, entsprechend 1,54 x 10^8 Zellen/ g Feuchtgewicht.

Die morphologische und funktionelle Intaktheit dieser Zellen wurde an Hand lichtmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen kontrolliert. Die Viabilität der resultierenden Zellsuspension betrug 95 %.

Die Qualität der Zellpräparation wurde auch durch Messung der Proteinsyntheseraten der Zellen bestimmt. Es zeigte sich, daß 10,22 ± 0,84 nmol (U-^{14}C) L-Leucin/ ml 5 %ige Zellsuspension/ h sofort nach der Isolierung eingebaut wurden. Nach einer 6-stündigen Inkubationszeit änderte sich die Proteinsyntheserate mit 10,66 ± 1,20 nmol (U-^{14}C) L-Leucin/ ml 5 %ige Zellsuspension/ h kaum, bei einer Viabilität von 92 %.

Die Proteinsyntheseraten waren nach 6-stündiger Inkubation der Zellsuspensionen mit der Translationshemmsubstanz Puromycin um 92 ± 7 %, nach Inkubation mit der Transkriptionshemmsubstanz α-Amanitin um 24 ± 3 % verringert worden.

Aus Mammakarzinomen wurden mit Hilfe zweier alternativer Aufschließungsverfahren (Methoden B und C) Zellen isoliert. Die Ausbeute betrug bei beiden Verfahren ca. 10 %, entsprechend 0,54 x 10^8 Zellen/ g Tumorgewebe.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten die morphologische Heterogenität der isolierten Zellen und bestätigten ihre Intaktheit. Die Viabilität betrug ca. 95%.

Rezeptorstudien an isolierten, intakten Hühnereileiterzellen zeigten eine spezifische, monophasische 17ß-Östradiol-bindende Komponente, die auf eine singuläre Bindungsstelle für das Hormon hinweist.

Für die scheinbare Dissoziationskonstante errechnete sich ein Wert von $2,8 \pm 1,6 \times 10^{-9}$ mol/l und eine maximale Bindungskapazität (MBC) von $28,1 \pm 4,2 \times 10^{-15}$ mol/mg Zellprotein.

Die getrennte Auswertung der Bindung in der Kern- und in der Cytoplasmafraktion (nach Inkubation der intakten Zellen) führte zu nicht-linearen Scatchardplots, die die Änderung der MBC durch die Translokation eines Teils der Rezeptoren bei der Titration wiederspiegelten. Daher konnten aus diesen Versuchen die MBC's und die scheinbaren Dissoziationskonstanten nur angenähert errechnet werden (im Cytoplasma: $K_d = 3,6 \pm 2,5 \times 10^{-9}$ mol/l und MBC = $3,6 \pm 5,0 \times 10^{-15}$ mol/mg Zellprotein; in der Kernfraktion: $K_d = 4,0 \pm 1,4 \times 10^{-9}$ mol/l und MBC = $38,1 \pm 8,0 \times 10^{-15}$ mol/mg Zellprotein).

Negativkontrollen zu diesen Scatchardanalysen mit nicht-steroidrezeptorhaltigen Hühnererythrozyten ließen bei der angewandten Methode keine spezifische Bindung erkennen.

Nach 10-minütiger Vorinkubation der Hühnereileiterzellen mit Diäthylstilböstrol (DES) vor der eigentlichen Inkubation, nahm die maximale Bindungskapazität der Zellen durch Abbau eines Teils der Rezeptoren ab. Diese Abnahme betrug nach der Vorinkubation mit 1 nmol DES/l $18,2 \pm 0,6$ % der MBC, entsprechend 70 % der besetzten Rezeptoren, und nach der Vorinkubation mit 10 nmol DES/l $37,0 \pm 1,3$ % der MBC, entsprechend 47 % der besetzten Rezeptoren. Trotz einer Zunahme des Abbaus waren also nach der Inkubation mit der höheren Hormonkonzentration mehr Hormon-Rezeptorkomplexe in der Zelle vorhanden, als nach der niedrigeren Hormonkonzentration. Die scheinbaren Dissoziationskonstanten änderten sich bei den Vorbeladungsversuchen nicht.

Auch die getrennte Auswertung der Bindung in der Cytoplasma-

und in der Kernfraktion nach einer 10 nmol DES/l Vorinkubation führte zu einer Abnahme der MBC um 28,2 ± 8,2 % im Cytoplasma und 42,9 ± 12,9 % in der Kernfraktion.

Die Translokationsexperimente mit isolierten Hühnereileiterzellen zeigten in Übereinstimmung mit den Scatchardanalysen, bei denen die Bindung getrennt im Cytoplasma und im Kern stattfand, daß der cytoplasmatische Rezeptor aktivierbar war und nach der Aktivierung in den Kern transloziert wurde.

Es konnten bei diesen Versuchen sowohl im Cytoplasma, als auch im Kernkompartiment zwei Maxima an spezifisch gebundener Radioaktivität gefunden werden (ein 1. Peak nach 15 bis 75 Minuten und ein 2. Peak nach 100 bis 200 Minuten).

Dabei zeigte es sich, daß sich das Auftreten des 2. Peaks mit zunehmender Hormonkonzentration verzögerte und auch seine Höhe zunahm. Dabei stieg die spezifische Bindung im Kernkompartiment bei 17ß-Östradiolkonzentrationen über 7,5 nmol/l besonders stark an, während sie im Cytoplasma über den ganzen Konzentrationsbereich von 1 bis 10 nmol/l hin kontinuierlich zunahm.

Der 1. Peak an spezifisch gebundener Radioaktivität zeigte kaum eine Abhängigkeit von der im Versuch eingesetzten Hormonkonzentration, dafür aber vom inneren hormonellen Milieu des Huhns. So betrug die Höhe des 1. Peaks bei den atrophischen Eileitern 72 ± 40 fmol/mg Zellprotein gegenüber 319 ± 59 fmol/mg Zellprotein beim Eileiter der hormonell aktiven Legehühner (im Cytoplasma dementsprechend 68 ± 21 fmol/mg Zellprotein zu 291 ± 98 fmol/mg Zellprotein).

Beim Einsatz der Hemmsubstanzen α-Amanitin und Puromycin zeigte sich, daß der 1. Peak kaum hemmbar war, also nicht auf der Neusynthese von Rezeptoren während der Inkubationszeit beruhte.

Der 2. Peak im Cytoplasma ließ sich zum größten Teil auf die Puromycin-hemmbare Neusynthese von Rezeptoren über bereits vor Versuchsbeginn in der Zelle vorhandener inaktiver m-RNA

zurückführen (80 % Hemmung der Bindung nach Inkubation mit Puromycin und 9 nmol/l tritiiertem 17ß-Östradiol). Nur ein geringer, aber konstanter Anteil der Bindung ging auf die α-Amanitin-hemmbare Neusynthese von Rezeptoren über die m-RNA-Synthese zurück (30 % Hemmung der Bindung nach Inkubation mit α-Amanitin und 9 nmol/l tritiiertem 17ß-Östradiol).

In der Kernfraktion überwog der Anteil der Bindung, der nicht auf einer Neusynthese von Rezeptoren beruhte. Die α-Amanitin- und Puromycin-hemmbare Bindung hatte über den gesamten 17ß-Östradiol-Konzentrationsbereich hin einen nahezu konstanten Wert.

Die Rezeptorstudien an isolierten Mammakarzinomzellen führten bei getrennter Auswertung der Bindung im Cytoplasma und in der Kernfraktion zu linearen Scatchardplots, obwohl drei der vier untersuchten Tumoren unter Nicht-Exchange-Bedingungen mit der Dextrankohle-Methode und der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation als rezeptornegativ einzustufen waren.

Bei dem vierten, rezeptorpositiven Tumor war mit der Ganzzellassay-Technik im Cytoplasma keine Bindung mehr nachzuweisen. In diesem Falle war die Translokation also vollständig abgelaufen.

Die maximalen Bindungskapazitäten reichten bei den untersuchten Tumoren von 6,3 bis 24,8 fmol/mg Zellprotein. Die scheinbaren Dissoziationskonstanten lagen zwischen 2,4 und 6,0 x 10^{-9} mol/l unter den Exchange-Bedingungen. Die maximalen Bindungskapazitäten der Zellen bei den beiden Praemenopausepatientinnen waren mehr als doppelt so hoch wie bei der Postmenopausepatientin.

Mit Hilfe der Ganzzellassay-Technik lassen sich bei den Mammakarzinomen, im Gegensatz zu den bisher gängigen Methoden, exakte Daten im Grenzbereich (MBC und K_d) unter physiologischen Bedingungen ermitteln, die Translozierbarkeit der Rezeptoren abschätzen und Bindungskontingente im Kern mitbestimmen.

LITERATURVERZEICHNIS

Allen, D. & Zamecnik, D. (1962)
Biochim. biophysica Acta 55, 865

Anderson, J., Clark, J.H. & Peck, E.J. (1972)
Biochem. J. 126, 561

Anderson, J., Peck, E.J. & Clark, J.H. (1973)
Endocrinology 92, 1488

Barnes, D.M., Ribeiro, G.G. & Skinner, I.G. (1977)
Europ. J. Cancer 13, 1133

Baxter, J.D., Higgins, S.J. & Rousseau, G.G. (1975)
in: Methods in Enzymology 36, 240
(O'Malley, B.W. & Hardman, J.G., Hrsg.) Academic Press,
New York

Beatson, G.T. (1896)
Lancet 2, 104

Berry, M.N. & Friend, D.S. (1969)
J. Cell Biol. 43, 506

Bloom, E.B., Matulich, D.T., Lan, N.C.,Higgins, S.J., Simons,
S.S. & Baxter, J.D. (1980)
J. Steroid Biochem. 12, 175

Bojar, H., Balzer, K., Reiners, K., Basler, M., Reipen, W. &
Staib, W. (1975a)
Z. Klin. Chem. Klin. Biochemie 13, 25

Bojar, H., Balzer, K., Boeminghaus, F. & Staib, W. (1975b)
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 31

Bojar, H., Balzer, K., Dreyfürst, R., Staib, W. & Wittliff,
J.L. (1976a)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 521

Bojar, H., Balzer, K., Dreyfürst, R., Staib, W. & Wittliff, J.L. (1976b)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 515

Bojar, H., Dreyfürst, R., Balzer, K. & Staib, W. (1976c)
Klin. Chem. 48, 119

Bojar, H., Basler, M., Fuchs, F., Broelsch, Ch. & Staib, W. (1976d)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 527

Bojar, H. & Staib, W. (1979)
in: SFB 113 Diabetisforschung Planungsbericht 1980 - 81 - 82, Universität Düsseldorf, 91

Bojar, H. (1980)
Beckman Report 10, 6

Boylan, E.S. & Wittliff, J.L. (1975)
Cancer Res. 35, 506

Brant, J.W.A. & Nalbandov, A.V. (1956)
Poultry Science 35, 692

Brenner, R.M., Resko, J.A. & West, N.B. (1974)
Endocrinology 95, 1094

Bruchovsky, N. & Van Dorn, E. (1976)
in: Breast Cancer: A Multidisciplinary Approach 1, 121
(St-Arneault, G., Band, P. & Israel, L., Hrsg.) Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York

Bucher, O. (1980)
in: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen 10, 77
(Bucher, O., Hrsg.) Hans Huber Verlag, Bern Stuttgart Wien

Büchli, K.A. & Keller, P.J. (1980)
J. Steroid Biochem. 13, 1253

Capuzzi, D.M., Rothman, V. & Margolis, S. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 421

Castro, J.R. (1974)
in: Current Concepts in the Treatment of Breast Cancer and Tumor Immunology 1
(Castro, J.R., Hrsg.) Hans Huber Verlag, Bern Stuttgart Wien

Chamness, G.C., Costlow, M.E. & McGuire, W.L. (1975)
Steroids 26, 363

Clark, J.H., Anderson, J. & Peck, E.J. (1972)
Science 176, 528

Consensus Report der Konferenz:
Steroid Receptors in Breast Cancer, 27. - 29. Juni 1979
National Institute of Health, Bethesda, Maryland

Dittmann, H. (1977)
in: Charakterisierung von Glucocorticoid-Rezeptoren 1, 71
Diplomarbeit der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität Düsseldorf

Eagle, H. (1959)
Science 130, 432

Emerson, W.J., Kennedy, B.J. & Taft, E.B. (1960)
Cancer 13, 1047

Eriksson, H.A., Hardin, J.W. & Markaverich, B. (1980)
J. Steroid Biochem. 12, 121

Feherty, P., Farrer-Brown, G. & Kellie, A.E. (1971)
Br. J. Cancer 25, 697

Fishman, J., Nisselbaum, J.S., Medendez-Botet, C.J. & Schwartz, M.K. (1977)
J. Steroid Biochem. 8, 893

Goldfine, I.D. (1977)
Mordern Pharmakology-Toxicology 11, 148

Gorski, J., Toft, D., Syamala, G., Smith, D. & Notides, A. (1968)
Recent Prog. Horm. Res. 24, 45

Gorski, J. & Gannon, F. (1976)
in: Annual Review of Physiology 38, 425
(Knobil, E., Sonnenschein, R.R. & Edelmann, I.S., Hrsg.)
Annual Reviews INC., Palo Alto, Calif.

Hähnel, R. & Twaddle, E. (1970)
Steroids 18, 653

Hähnel, R. & Twaddle, E. (1978)
Eur. J. Cancer 14, 125

Hartmann, G., Behr, W., Beissner, K.-A., Honikel, K. & Sippel, A. (1968)
Angew. Chem. 80, 710

Hommes, F.A., Draisma, M.J. & Molenaar, J. (1970)
Biochem. Biophys. 222, 361

Howard, R.B. & Pesch, L.A. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 3105

Ingebretsen, W.R. & Wagle, S.R. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 74, 403

Jensen, E.V. & Jacobson, H.I. (1960)
in: Biological Activity of Steroids in Relation to Cancer 1, 161
(Pincus, G. & Vollmer, E.P., Hrsg.) Academic Press, New York

Jensen, E.V. & Jacobson, H.I. (1962)
Recent Prog. Horm. Res. 18, 387

Jensen, E.V. & DeSombre, E.R. (1972)
Ann. Rev. Biochem. 41, 203

Jensen, E.V. & DeSombre, E.R. (1977)
in: Modern Pharmacology-Toxicology Volume 8 1, 240
(Pasqualini, J.R., Hrsg) Marcel Dekker Inc., New York and Basel

Johnson, H.E.M., Das, N.M., Butcher, E.R. & Fain, J.N. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3229

Kalimi, M., Beato, M. & Feigelson, P. (1973)
Biochem. 12, 3365

Kalimi, M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Clark, J.H. & O'Malley, B.W. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 616

Katzenellenbogen B.S. & Gorski, J. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 1299

Kennedy, B.J. (1974)
Sem. Oncol 1, 119

King, R.J.B., Cowan, D.M. & Inman, D.R. (1965)
J. Endocrinol. 32, 83

King, R.J.B. (1970)
in: Research on Steroids 4, 259
(Finkelstein, M., Klopper, A., Conti, C. & Cassano, C., Hrsg.)
Pergamon, Oxford

King, R.J.B. & Mainwaring, W.I.P. (1974)
in: Steroid-Cell Interactions 1, 1
(King, R.J.B. & Mainwaring, W.I.P., Hrsg.) Butterworth, London

Korenman, S.G. (1968a)
J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 127

Korenman, S.G. & Rao, B.R. (1968b)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 1028

Korenmann, S.G. & Dukes, B.A. (1970)
J. Clin. Endocrinol. 30, 639

Krebs, H.A. & Henseleit, K. (1932)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33

Kyser, K.A. & Thesis, Ph.D. (1970)
University of Chicago

Legha, S.S., Davis, H.L. & Muggia, F.M. (1978)
Annals of Internal Medicine 88, 69

Liang, T. & Liao, S. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 706

Lindell, T.J., Weinberg, F., Morris, P.W., Roeder, R.G. &
Rutter, W.J. (1970) Science 170, 447

Lippmann, M.E. & Bolan, G. (1975)
Nature 256, 592

Liskowski, L. & Rose, D.P. (1976a)
Clin. Chim. Acta 67, 175

Liskowski, L., Rose, D.P., Dondlinger, T. & Jeffrey, S.S.
(1976b) Clin. Chim. Acta 71, 309

Ljungkwist, H.I. (1967)
Acta Endocrinologica 56, 391

Martin, A.N., Swarbrick, J. & Cammarata, A. (1975)
in: Physikalische Pharmazie 1, 1
(Ehrhardt, L., Hrsg.) Wissenschaftl. Verlagsanstalt, Stuttgart

McGuire, W.L. & DeLaGarza, M. (1973)
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37, 986

McGuire, W.L., Carbone, P.P., Sears, M.E. & Escher, G.C. (1975a)
in: Estrogen Receptors in Human Breast Cancer 1, 1

(McGuire, W.L., Escher, G.C. & Carbone, P.P., Hrsg.) Raven Press, New York

McGuire, W.L. (1975b)
in: Methods in Enzymology 36, 248
(O'Malley, B.W. & Hardman, J.G., Hrsg.) Academic Press, New York

McGuire, W.L., Pearson, O.H. & Segaloff, A. (1975c)
in: Estrogen Receptors in Human Breast Cancer 1, 17
(McGuire, W.L., Escher, G.C. & Carbone, P.P., Hrsg.) Raven Press, New York

McGuire, W.L., Horwitz, K.B., Pearson, O.H. & Segaloff, A. (1977)
Cancer 39, 2934

Mester, J. & Baulieu, E.E. (1975)
Biochem. J. 146, 617

Miller, W.R. & Forrest, A.P.M. (1974)
Lancet 2, 866

Munck, A. & Wira, C. (1975)
in: Methods in Enzymology 36, 255
(O'Malley, B.W. & Hardman, J.G., Hrsg.) Academic Press, New York

Nalbandov, A.V. (1976)
in: Reproductive Physiology of Domestic and Laboratory Animals and Man 1, 143
(Nalbandov, A.V., Hrsg.) Freeman and Company, San Franzisco

O'Malley, B.W., McGuire, W.L., Kohler, P.O. & Korenman, S.G. (1969)
Recent Prog. Horm. Res. 25, 105

O'Malley, B.W. & Means, A.R. (1974)
Science 183, 610

Palmiter, R.D. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 6770

Palmiter, R.D. (1975)
Cell 4, 189

Paul, J. (1975)
in: Cell and Tissue Culture 5, 361
(Paul, J., Hrsg.) Churchill Livinstone, Edinburgh London and New York

Pennequin, P., Robins, D.M. & Schimke, R.T. (1978)
Eur. J. Biochem. 90, 51

Richterich, R. (1971)
in: Klinische Chemie 3, 305
(Richterich, R., Hrsg.) Karger, Basel

Rick, W. (1972)
in: Klinische Chemie und Mikroskopie 1, 179
(Rick, W., Hrsg.) Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York

Rochefort, H., Andre, J., Baskevitch, P.-P., Kallos, J., Vignon, F. & Westley, B. (1980)
J. Biochem. 12, 135

Rosen, P.P., Medendez-Botet, C.J., Urban, J.A., Fracchia, A., & Schwartz, M.K. (1977)
Cancer 39, 2194

Sarff, M. & Gorski, J. (1971)
Biochem. 10, 2557

Savlov, E.D., Wittliff, J.L., Hilf, R. & Hall, T.C. (1974)
Cancer 33, 303

Scatchard, G. (1949)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660

Schinzinger, A.S. (1889)
zitiert nach Trams, G & Maass. H., Oncology 3 (1980)

Schöll, A. (1975)
in: Therapieergebnisse bei Mammakarzinomen nach Androgenbehandlung und Ovarektomie 1, 1
(Schöll, A., Hrsg.) Thieme, Stuttgart

Seaver, S.S., Hoffmann, J.F. & Coulson, P.B. (1980)
J. Steroid Biochem. 13, 1269

Seglen, P.O. (1972a)
Expt. Cell. Res. 74, 450

Seglen, P.O. (1972b)
Expt. Cell Res. 76, 25

Seglen, P.O. (1973)
Expt. Cell. Res. 82, 391

Seifter, S. & Harper, E. (1970)
in: Methods in Enzymology 19, 613
(Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., Hrsg.) Academic Press, New York

Slein, M.W. (1962)
in: Methods in Enzymology 10, 415
(Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., Hrsg.) Academic Press, New York

Swaneck, G.E., Tsai, M.-J. & O'Malley, B.W. (1980)
J. Steroid Biochem. 12, 185

Stoll, B.A. (1974)
in: Mammary Cancer and Neuroendocrine Therapie 1
(Stoll, B.A., Hrsg.) Butterworth, London

Tata, J.R. (1976)
Cell 9, 1

Talwor, G.P., Segal, S.J., Evans, A. & Davidson, O.W. (1964)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52, 1035

Toft, D. & Gorski, J. (1966)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 1574

Trams, G. & Maass, H. (1977)
Cancer Res. 37, 258

Träger, L. (1977)
in: Steroidhormone: Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung 1, 1
(Träger, L. Hrsg.) Springer Verlag, Berlin Heidelberg New
York

Tsai, S.Y., Harris, S.E., Tsai, M.-J. & O'Malley, B.W. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 4713

Wagner, R.K. (1972)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1235

Weichselbaum, T.E. (1946)
Amer. J. Clin. Path. 10, 40

Williams, D. & Gorski, J. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3464

Williams, D. & Gorski, J. (1973)
Biochem. 12, 297

Williams, D. & Gorski, J. (1974)
Biochem. 13, 5537

Wittliff, J.L., Hilf, R. & Brooks, W.F. Jr. (1971)
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 12, 47

Wittliff, J.L., Hilf, R., Brooks, W.F. Jr., Savlov, E.D.,
Hall, T.C. & Orlando, R.A. (1972)
Cancer Res. 31, 1983

Wittliff, J.L. (1974)
Sem. Oncol. 1, 109

Wittliff, J.L. & Savlov, E.D. (1975)
in: Estrogen Receptors in Human Breast Cancer 1, 73
(McGuire, W.L., Escher, G.C. & Carbone, P.P. Hrsg.) Raven
Press, New York

Wittliff, J.L., Beatty, B.W., Savlov, E.D., Patterson, W.B. &
Cooper, R.A. (1976)
in: Recent Results in Cancer Research 1, 59
(St-Arneault, G., Band, P. & Israel, L. Hrsg.) Springer
Verlag, Berlin Heidelberg New York

Wittliff, J.L., Beatty, B.W., Baker, D.T. Jr., Savlov, E.D. &
Cooper, R.A. (1977)
in: Estrogen Receptors in Breast Cancer 1, 393
Elsevier/north-Holland Press

Wittliff, J.L. & Savlov, E.D. (1978)
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 4, 463

Younger, J.S. (1954)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 202

Zava, D.T., Chamness, G.C., Horwitz, K.B. & McGuire, W.L.
(1974)
Science 196, 663

Zava, D.T. & McGuire, W.L. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 3703

D a n k s a g u n g

==========

Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Staib für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und Herrn Prof. Dr. H. Bojar aus dem Institut für Onkologische Biochemie der Universität Düsseldorf für die Überlassung der Arbeit, die vielfachen Anregungen und die Durchsicht dieser Arbeit danken.

Herrn Kump und Herrn Müller von der Werkstatt der physiologischen Biochemie II der Universität Düsseldorf gilt mein besonderer Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Planung und Herstellung des Kernseparators.

Frau Gisela Servus (Anatomisches Institut II der Universität Düsseldor) danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Lebenslauf

9. Oktober 1955	Geburt in Essen als Sohn der Eheleute Werner und Elisabeth Subkowski
1961 - 1966	Besuch der Hellweg-Volksschule in Essen
1966 - 1974	Besuch des Bischöflichen Gymnasiums am Stoppenberg in Essen
November 1974 - März 1975	Tätigkeit als Hilfspfleger in der psychiatrischen Universitätsklinik Essen
ab April 1975	Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf

Düsseldorf, den 30.5.81

Peter Subkowski